

Aus der Klinik für Urologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Maurice Stephan Michel)

Gene mit regulatorischer Funktion für die exosomale Sekretion: Welche Rolle spielen sie im Prostatakarzinom?

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorengrades
der Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu Heidelberg

vorgelegt von
Yannic Meyer
aus Wolfhagen

September 2017

Dekan: Prof. Dr. Sergij Goerdts
Referent: PD. Dr. med. Philipp Erben

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 1 |
| 1 Einleitung | 3 |
| 1.1 Prostatakarzinom | 3 |
| 1.2 Exosomen | 8 |
| 1.3 Fragestellung | 13 |
| 2 Material und Methoden | 14 |
| 2.1 Übersicht zur Vorgehensweise | 14 |
| 2.2 Erstellung des Panels von Genen zur Untersuchung | 16 |
| 2.3 Kohorten: <i>In silico</i> | 16 |
| 2.3.1 Taylor <i>et al.</i> (DS1): Lokalisierte, lokal fortgeschrittene PCa und Metastasen | 17 |
| 2.3.2 Yu <i>et al.</i> (DS2): Primäre PCa und Metastasen | 18 |
| 2.3.3 Tomlins <i>et al.</i> (DS3): Lokalisierte PCa und Metastasen | 19 |
| 2.4 Kohorten: Quantitative PCR (cDNA) | 21 |
| 2.4.1 TUR-Kohorte | 21 |
| 2.4.2 Tissue Scan Array | 23 |
| 2.5 Selektion von Kandidatengenen anhand von Microarray-Daten | 23 |
| 2.6 Berechnung relativer Genexpressionen in Microarray-Datensätzen | 24 |
| 2.7 Gruppenvergleiche <i>in silico</i> und in cDNA-Kohorten | 26 |
| 2.8 Primer und Sonden | 26 |
| 2.9 RNA-Isolation | 28 |
| 2.10 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) | 29 |
| 2.11 Quantitative PCR | 30 |
| 2.12 Überlebensabfrage | 32 |
| 2.13 Statistische Auswertung | 32 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3 | Ergebnisse | 34 |
| 3.1 | Identifizierung von Kandidatengenen | 34 |
| 3.2 | Expression der Kandidaten im lokalisierten PCa und in Metastasen . . . | 39 |
| 3.3 | Assoziation der Kandidaten mit dem lokalen Tumorstadium | 41 |
| 3.4 | Assoziation der Kandidaten mit dem Grading nach Gleason | 41 |
| 3.5 | Assoziation der Kandidaten mit Androgendeprivationstherapie | 43 |
| 3.6 | Expression von AR in PCa, Assoziation mit Differenzierung und Andro- gendeprivationstherapie | 44 |
| 3.7 | Einfluss der Kandidaten auf das Gesamtüberleben | 45 |
| 3.8 | Korrelationsanalysen der Genexpressionen untereinander | 46 |
| 4 | Diskussion | 48 |
| 4.1 | Zusammenstellung des Kandidatenpanels, Selektionsprozess und zur wei- teren Analyse ausgewählte Gene | 48 |
| 4.2 | Assoziation der Kandidaten mit klinischen und pathologischen Parametern | 51 |
| 4.3 | Korrelationen der Kandidaten untereinander | 57 |
| 4.4 | Expression der Kandidaten im Kontext der Androgendeprivationstherapie und der Expression von AR | 59 |
| 4.5 | Limitationen der Studie | 62 |
| 4.6 | Schlussfolgerungen | 62 |
| 5 | Zusammenfassung | 64 |
| | Abbildungsverzeichnis | 66 |
| | Tabellenverzeichnis | 67 |
| | Literaturverzeichnis | 68 |
| | Eigene Publikationen | 89 |
| | Anhang | 90 |
| | Lebenslauf | 102 |
| | Danksagung | 103 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| ADT | Androgendeprivations-Therapie |
| AR | Androgenrezeptor |
| AS | Active Surveillance |
| BCR | Biochemisches Rezidiv |
| BPH | Benigne Prostatahyperplasie |
| DRU | Digital-rektale Untersuchung |
| ESCRT | Endosomal Sorting Complexes Required For Transport |
| EV | Extrazelluläre Vesikel |
| FFPE | Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet |
| GAP | GTPase-activating protein |
| GEF | Guanosin diphosphat/triphosphat Exchange Factor |
| hnPCa | Prostatakarzinom ohne Androgendeprivations-Therapie |
| htPCa | Prostatakarzinom mit Zustand nach Androgendeprivations-Therapie |
| M-MLV RT | Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase |
| MVB | Multi-Vesicular-Bodies |
| PAP | Prostataspezifische saure Phosphatase |
| PCA3 | Prostate cancer antigen 3 |
| PCa | Prostatakarzinom |

| | |
|----------------|---|
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PIA | proliferative inflammatorische Atrophie |
| PIN | Prostatische intraepitheliale Neoplasie |
| PSADT | PSA-Verdoppelungs-Zeit |
| PSA | Prostataspezifische Antigen |
| PSMA | Prostate specific membrane antigen |
| RT-qPCR | Quantitative Echtzeit-PCR |
| TRUS | Transrektaler Ultraschall |
| TUR | Transurethrale Resektion |
| TUR-P | Transurethrale Resektion von Prostatagewebe |
| WW | Watchful Waiting |

1 Einleitung

1.1 Prostatakarzinom

Epidemiologie, Risikofaktoren und Ätiologie

Das Prostatakarzinom (PCa) ist gegenwärtig das häufigste nicht kutane Karzinom in Deutschland und stellt bei Männern nach dem Bronchialkarzinom und dem kolorektalen Karzinom die dritthäufigste krebsassoziierte Todesursache dar.¹ 13,2% aller Männer erkranken im Laufe ihres Lebens symptomatisch an einem PCa. Damit bildet das PCa einen relevanten Kostenfaktor für das Gesundheitssystem.² Der Großteil der Karzinome wird in den Stadien T1 und T2 diagnostiziert¹ und die Prognose ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 93% relativ gut, wobei die meisten Todesfälle durch Metastasen bedingt sind.³ Das PCa tritt vor allem bei älteren Männern auf: Mit 45 Jahren beträgt das Risiko, in den nächsten 10 Jahren zu erkranken 0,5%, mit 55 Jahren bereits 2,7% und erreicht liegt im Alter von 65 Jahren bei 6,3%.⁴ Zusätzlich zu den symptomatisch und damit klinisch relevant erkrankenden Patienten kann in Autopsien bei einem Großteil der Männer ein PCa nachgewiesen werden.⁵

In der Frühphase bleibt das PCa in der Regel asymptomatisch, bei lokal fortgeschrittenen Stadien können Hämaturie, Harnverhalt, Inkontinenz und Harnstauungsniere auftreten, bei Metastasierung sind Knochenschmerzen sowie Gewichtsverlust möglich. Metastasen bilden sich beim PCa meist als osteoblastische Läsionen im Skelettsystem.

Die Ätiologie des PCa ist weitestgehend ungeklärt. Einige Studien zeigen, dass westliche Ernährung mit hohen Anteilen von ungesättigten Fettsäuren und rotem Fleisch die Entstehung des PCa begünstigt. Im Gegensatz zu vielen anderen Krebserkrankungen

scheint Tabakkonsum die Erkrankungswahrscheinlichkeit nicht zu erhöhen.⁶ Weitere Risikofaktoren sind Adipositas, eine familiäre Vorbelastung und vermehrte Aufnahme von Vitamin E.⁷⁻⁹

Die Vorläuferläsion des PCa ist die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN), deren Entstehung möglicherweise durch inflammatorische Regulationsmechanismen im Rahmen einer chronischen Entzündung der Prostata, der proliferativen inflammatorischen Atrophie (PIA), begünstigt wird.^{6,10,11}

Der Weg von diesen Vorläuferläsionen zum metastasierten Stadium ist durch mehrere Schlüsselereignisse geprägt: Lokale Ausbreitung und Transformation vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp, Invasion von Blutgefäßen und Zirkulation von Tumorzellen, Extravasation in Zielorganen und schließlich die Bildung der Tochtergeschwülste.¹² Jeder dieser Schritte wird durch komplexe Kaskaden molekularer Mechanismen geprägt, deren besseres Verständnis die Tür zu gezielteren Therapien öffnen könnte.¹²

Diagnostik

Ab einem Alter von 45 Jahren werden im Rahmen des gesetzlichen Früherkennungsprogrammes Beschwerden beim Wasserlassen erfragt und eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Die Bestimmung des PSA (Prostataspezifisches Antigen) wird im Rahmen der gesetzlichen Präventionsprogramme nicht empfohlen, da bisher kein Nutzen für das Überleben nachgewiesen werden konnte.^{1,4} Dennoch wird der PSA-Test in der Praxis oft als Screeninguntersuchung eingesetzt.^{13,14}

In der Primärdiagnostik werden DRU (digital-rekale Untersuchung) und bei Bedarf Transrektaler Ultraschall (TRUS) oder eine multiparametrische MRT-Bildgebung hinzugezogen.^{4,15,16} Die Sicherung der Diagnose erfolgt typischerweise mittels ultraschallgestützter, transrektaler Biopsie.⁴

Für die Klassifikation der Differenzierung wird in der Regel das Grading nach Gleason herangezogen, welches den Entartungsgrad anhand der Drüsenarchitektur einteilt.¹⁷

Neben der gezielten Diagnostik wird ein relevanter Anteil der Karzinome inzidentell bei transurethralen Resektionen (TUR) zur Therapie einer symptomatischen benignen Prostatahyperplasie (BPH) entdeckt.¹⁸

Der am weitesten verbreitete Biomarker für das PCa ist das Prostata-spezifische Antigen (PSA). Dieses Protein findet sich physiologischerweise nur zu geringen Mengen im Blut und gelangt bei Störung der Prostata-drüsenarchitektur zunehmend in die Blutbahn.¹⁹ Gerade bei älteren Männern sind jedoch BPH und Prostatitis häufige Ursachen für einen Anstieg des Serum-PSA,²⁰ weshalb der Einsatz des PSA-Tests für Frühdiagnostik und Screening entsprechend umstritten²¹ ist, da er zu Überdiagnostik und Übertherapie führt.^{22,23} Versuche, die Güte des PSA-Tests (z.B. durch Berücksichtigung der Dynamik der Serumspiegel) zu verbessern waren teilweise erfolgreich, unterliegen jedoch den selben Limitierungen wie der PSA-Test selbst.¹⁹ Weitere im Urin bestimmbare Biomarker wie *PCA3* (*Prostate cancer antigen 3*) und *TMPRSS2-ERG*, einem Fusionsgen aus der *Transmembran Protease, Serin 2* und dem *ETS-related gene* konnten sich bisher nicht flächendeckend durchsetzen.^{4,24}

Das onkologische Staging erfolgt nach der S3-Leitlinie zum PCa von 2016.⁴ Die lokale Tumorausdehnung wird anhand einer DRU und je nach Befund und Risikoprofil weiteren, bildgebenden Untersuchungen bestimmt.

In der Nachsorge wird in der Regel der PSA-Wert, welcher nach radikaler Prostatektomie gewöhnlicherweise abfällt, kontrolliert und eine körperliche Untersuchung durchgeführt.²¹ Einem klinisch manifesten Rezidiv geht zumeist ein Anstieg des PSA, das biochemische Rezidiv (BCR), voraus.⁴

Molekulare Diagnostik

Die Einschätzung der Lebenserwartung und des Risikos, am PCa zu versterben, stellen aufgrund der therapeutischen Implikationen zentrale Herausforderungen in der Diagnostik des PCa dar.²¹ Aggressive PCa, die einer intensiveren Therapie bedürfen sind von indolenteren Tumoren, die erst später oder nie klinisch relevant werden, abzugrenzen. Diese Einschätzung der Prognose und damit die Auswahl der Therapie basieren aktuell

größtenteils auf klinischen Parametern sowie dem histopathologischen Grading.⁴ Hierbei ist das Grading nach Gleason zwar etabliert und ubiquitär verfügbar, erfasst jedoch nur bedingt funktionelle Aspekte und unterliegt Einschränkungen bei der Interrater-Reliabilität.²⁵

Analysen der Expression einzelner Gene^{26,27} oder von Expressionsprofilen^{28,29} liefern hingegen über morphologische Aspekte hinaus einen relevanten Einblick in den Funktionszustand der Zellen, sind besser quantifizierbar und weniger vom Untersucher abhängig. Dafür ist keine direkte morphologische Korrelation möglich und die Methodik verhältnismäßig aufwändiger.

Trotz der Entwicklung verschiedener Scores auf der Basis von Genexpressions-Profilen³⁰ konnte in der molekularen Diagnostik bisher kein durchschlagender Erfolg erreicht werden.³¹ Um zielführendere, personalisierte Therapieentscheidungen zu treffen sind bessere diagnostische Marker nötig, was ein verbessertes Verständnis der Tumorbilogie voraussetzt. Fortschritte in diesem Bereich könnten auch neue therapeutische Ansätze offenbaren.

Therapie

Grundsätzlich stehen folgende kurative und palliative Therapieoptionen zur Verfügung:

- Watchful Waiting (WW)
- Active Surveillance (AS)
- Radikale Prostatektomie
- Perkutane Radiotherapie
- Brachytherapie
- Hormonablativ Therapie (auch Androgendeprivations-Therapie (ADT))
- Chemotherapie
- Transurethrale Resektion (TUR)

Eine kurative Therapie selbst bei lokal fortgeschrittenem und lymphogen metastasierten Stadium noch möglich und auch unbehandelt verläuft die Erkrankung meist langsam: Nur Männer mit einer Lebenserwartung von mindestens 10-15 Jahren profitieren von einer kurativen Therapie.⁴

Bei Patienten mit einem niedrigen Risikoprofil kann eine AS sinnvoll sein und bei einer eingeschränkten Lebenserwartung ein abwartendes Vorgehen im Sinne des WW erwogen werden.^{4,32,33} Bei der AS finden in engmaschige Kontrolluntersuchungen statt, um bei Befundverschlechterung eine *kurative* Therapie einzuleiten während bei der WW klinische Manifestationen *palliativ* therapiert werden.

Beim lokal begrenzten PCa stehen als primäre, kurative Therapieoptionen die radikale Prostatektomie, die perkutane Strahlentherapie oder Varianten der Brachytherapie zur Verfügung. Zur Prostatektomie werden offene, konventionelle laparoskopische und zunehmend auch roboterassistierte, laparoskopische Verfahren eingesetzt.^{34,35} Je nach erwarteter Tumorausdehnung wird im Rahmen der Operation eine Lymphadenektomie durchgeführt und bei lokal fortgeschrittenen oder unvollständig resezierten Tumoren kann eine adjuvante Behandlung mittels Radiatio und/oder ADT eingesetzt werden.⁴

Patienten mit primär metastasiertem Karzinom können mit dem Ziel der Symptomverbesserung und zur Verzögerung der Progression eine ADT erhalten,⁵ welche mittels LHRH-Agonisten, GnRH-Antagonisten, Hemmern der Androgensynthese, Antiandrogenen oder bilateraler Orchiektomie erfolgen kann.⁴ Typische Nebenwirkungen sind Verlust der Sexualfunktion, Erschöpfung, Gynäkomastie, Anämie, Osteoporose und vermehrte kardiovaskuläre Erkrankungen.^{36,37}

Nach initialem Ansprechen auf eine ADT entwickeln viele Karzinome nach einiger Zeit eine Resistenz gegen den Androgenentzug (Kastrationsresistenz, CRPC). In diesem Falle bleiben als Therapieoptionen chemotherapeutische Verfahren wie die Taxan-basierte Therapie mit Docetaxel.³⁸ Für die Refraktärität gegenüber dem Androgenentzug werden aktuell vor allem vier verschiedene Mechanismen diskutiert:

- AR-Überexpression durch Amplifikation oder erhöhte Stabilität der Proteine³⁹
- Androgenrezeptormutationen (insbesondere beim fortgeschrittenen PCa)⁴⁰
- Ligandenunabhängige, konstitutive Aktivierung^{41,42}
- Verstärkte Expression oder Aktivität von Koaktivatoren des AR⁴³

Bei fortgeschrittenen Stadien schränken durch das Karzinom bedingte Stenosen der Urethra die Lebensqualität einiger Patienten ein. Hier kann eine palliative TUR des

Prostatagewebes zur Beseitigung der Stenose durchgeführt werden.⁴⁴ Andernfalls kann zur Entlastung eine suprapubische Harnableitung erfolgen.

Weiterhin befinden sich aktuell systemische Therapien zur Aktivierung des Immunsystems gegen das Karzinom durch Vakzinierung mit Peptiden oder Nukleinsäuren in der Erforschung.⁴⁵

1.2 Exosomen

Definition

Exosomen sind mit Proteinen und Nukleinsäuren beladene extrazelluläre Vesikel (EV),^{46,47} deren Biogenese und Funktion seit einigen Jahren Gegenstand zunehmender Forschungsbemühungen ist: Bei Pubmed finden sich über 5000 wissenschaftliche Publikationen zu Exosomen, von denen der Großteil in den letzten Jahren veröffentlicht wurde (Stand Juli 2017; siehe Abbildung 1.1).

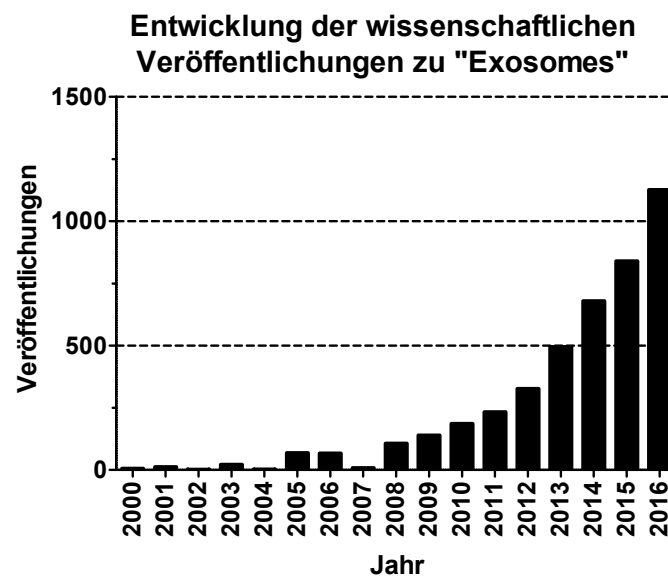


Abbildung 1.1: Entwicklung der Einträge zu „Exosomes“ bei PubMed zwischen 2000 und 2017. (Zugriffsdatum 21.07.2017)

Als Population konnten die Vesikel bisher nicht präzise und einheitlich definiert werden,⁴⁸ da ihre Biogenese nur zum Teil geklärt ist und zur Definition verschiedene Ansätze

herangezogen werden: So wird der Begriff von unterschiedlichen Gruppen anhand von Biogenese (endosomale Herkunft, Genese über Multi-Vesicular-Bodies (MVB)), physikalischer und morphologischer Eigenschaften (Größe von ca. 50-100 nm, napfförmige Konfiguration in Elektronenmikroskopie, Aggregation in einem Sucrose-Gradienten bei 1,13-1,19 g/ml) oder der Isolationsmethode (meist Pelletierung bei Zentrifugation mit 100.000 g) festgelegt.⁴⁸⁻⁵⁰ Teils werden diese Varianten auch vermischt. Der Begriff „Exosomen“ wird abseits der extrazellulären Vesikel auch für Ribonucleasekomplexe im Rahmen der RNA-Verarbeitung verwendet.⁴⁸ In dieser Studie steht der Begriff für potentiell biologisch aktive, 50-100 nm messende, extrazelluläre Vesikel endosomaler Herkunft.

Genese und Biologie

Die EVs werden von verschiedenen Zellpopulationen sezerniert und sind in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Speichel und Muttermilch enthalten.⁴⁷ Physiologisch sind sie an Entwicklung des Immunsystems, Antigenpräsentation bei Immunabwehr, Apoptose, Angiogenese, Entzündung und Blutgerinnung beteiligt.⁴⁷ Zusätzlich können sie Prionen und Viren zwischen Zellen übertragen.⁵¹

Aufgrund ihrer Genese besitzen Exosomen dieselbe Membranorientierung wie die sezernierende Zelle, ihr Inhalt kann sich jedoch von der Ursprungszelle erheblich unterscheiden, was auf einen kontrollierten Ausleseprozess hinweist.⁴⁴

Ein gut untersuchter Mechanismus zur Produktion der Exosomen ist die Ausschüttung von MVBs an der Zellmembran (siehe Abb. 1.2 auf S. 10). Die MVBs entstehen durch intrazelluläre Einwärtseinstülpung von Endosomen, schütten zum Teil ihren Inhalt durch Fusion mit der Zellmembran aus, teilweise werden sie auch durch Fusion mit Lysosomen abgebaut.⁵⁰ Bei der Produktion von MVBs sind unter anderem Komponenten des Endosomal Sorting Complexes Required For Transport (ESCRT) beteiligt. Sie identifizieren ubiquitinylierte Proteine, reichern sie an der endosomalen Membran an (ESCRT-0), erzeugen Membraneinstülpungen (ESCRT-I, -II) und initiieren die Abschnürung von der endosomalen Membran. Abgesehen davon scheint es noch weitere, von ESCRT unabhängige Mechanismen bei der Entstehung der MVBs zu geben, wobei Lipide

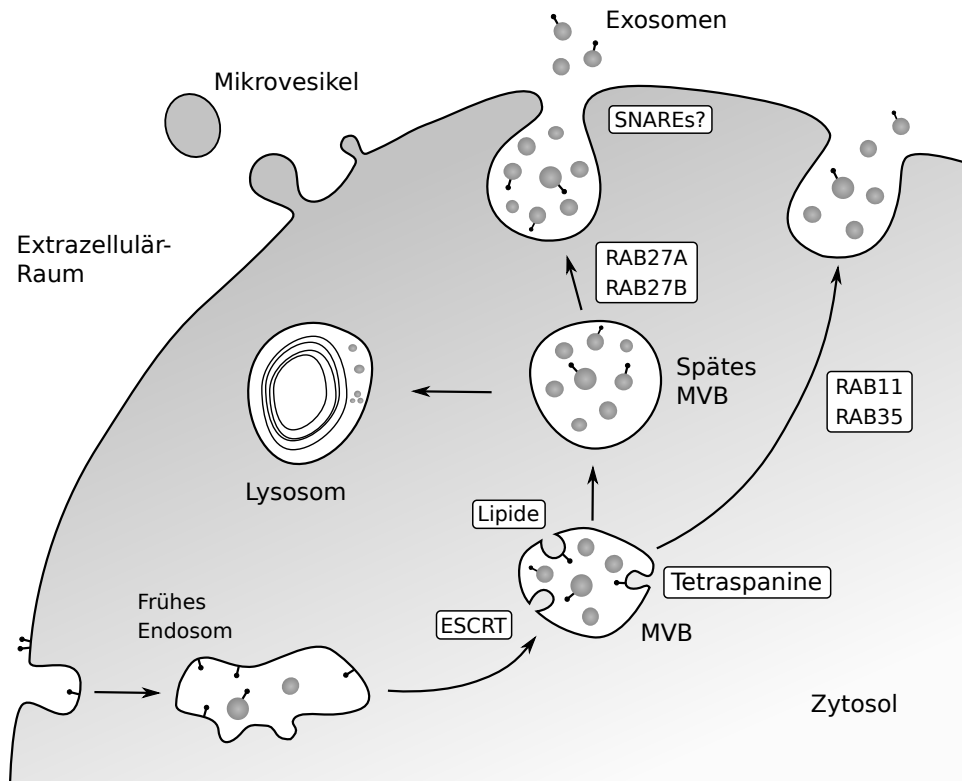


Abbildung 1.2: Intrazelluläre Mechanismen der exosomalen Produktion. Schematische Abbildung der Herstellung und Freisetzung von Exosomen durch eukaryotische Zellen. Exosomen werden als intraluminale Vesikel (ILV) an der Membran von *frühen Endosomen* und *MVBs* (*Multivesicular Bodies*) produziert. An der Genese dieser ILVs sind *ESCRT-Komponenten*, *Lipide* (u.a. Ceramie) und *Tetraspanine* beteiligt. Die MVBs werden nach ihrer Befüllung mit ILVs entweder durch Fusion mit *Lysosomen* abgebaut oder verschmelzen mit der Zellmembran, wodurch die Exosomen freigesetzt werden. Der Transport und die Ausschüttung der MVBs wird durch verschiedene *Rab Proteine* (*RAB11*, *RAB27A*, *RAB27B*, *RAB35*) vermittelt. Weiterhin sind möglicherweise *SNARE-Komplexe* an der Fusion der MVBs mit der Plasmamembran beteiligt. Andere Arten von sezernierten Vesikeln werden direkt an der Plasmamembran abgeschnürt und werden meist als *Mikrovesikel* oder Mikropartikel bezeichnet. (Abbildung und Beschreibung nach Kowal *et al.* (2014, Current Opinion in Cell Biology)⁴⁹)

wie Sphingosin-1-Phosphat und Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen beteiligt sein könnten.^{50,52}

Die Sekretion der Exosomen durch Fusion des MVB mit der Zellmembran wird unter anderem durch die GTPasen RAB27A und RAB27B reguliert,⁵³ weitere Proteine wie Plectin und RAB11 scheinen je nach Zelltyp ebenfalls beteiligt zu sein.⁵⁰ Möglicherweise bestehen noch weitere, unbekannte und von MVBs unabhängige Produktionsmechanismen.⁵⁴

Aufgrund dieser endosomalen Herkunft tragen die Vesikel Membrantransport- und Fusionsproteine (GTPasen, Annexine, Flotilline), Tetraspanine (CD9, CD63, CD81, CD82), Heat-Shock-Proteine (HSC70 und HSP90) sowie an der Genese der MVBs beteiligte Proteine (Alix, TSG101) auf ihrer Oberfläche. Abhängig von der Ursprungs-Zelle gibt es Unterschiede im tatsächlichen Gehalt der verschiedenen Merkmale.^{47,54} Exosomen enthalten weiterhin erhebliche Mengen RNA (miRNA, mRNA, non-coding RNA) und verschiedene Proteine,⁴⁷ über die sie andere Zellen beeinflussen können.⁵⁵

Exosomen in der Tumorbilogie

Die entarteten Zellen verschiedener Tumorentitäten produzieren vermehrt Exosomen,⁵⁶ mittels welcher sie andere Zellen manipulieren können.⁵⁷ So sind Exosomen von Karzinomzellen im Kontext der lokalen Progression von Krebserkrankungen in der Lage, im Microenvironment für den Tumor förderliche Myofibroblasten zu aktivieren,⁵⁸ das Gefäßwachstum zu stimulieren⁵⁹ und sie sind an der Entwicklung und Regulation von Invadopodien beteiligt.⁶⁰ Ein weiterer wichtiger Faktor für die Tumorentstehung ist die Umgehung der Abwehrmechanismen des Körpers. Auch hier ist die exosomale Signalübertragung unter anderem durch Beeinflussung der Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu Suppressor-Zellen,⁶¹ Manipulation der T-Zell-Funktion⁵⁰ und Hemmung der NK-Zell-Aktivität⁶² beteiligt.

Außerhalb des primären Entstehungsortes tragen die EVs über verschiedenen Mechanismen zur Metastasierung bei: Sie können an der epithelial-mesenchymalen Transformation beteiligt sein,⁶³ sind in der Lage, die (prä-)metastatische Nische u.a. durch Rekrutierung von Stammzellen vorzubereiten⁵⁵ und sind an der Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke

beteiligt.⁶⁴ Beim PCa gibt es Hinweise, dass Invasivität und Überlebensfähigkeit der PCa-Zellen über exosomale Sekretion gesteigert werden könnten und dass PCa-Exosomen Fettstammzellen zu einem neoplastischen Phänotyp transformieren können.⁶⁵

Weiterhin spielen Exosomen bei Etablierung und Transfer von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika eine Rolle.^{66–71}

Exosomen in Diagnostik und Therapie

Aufgrund der einfachen Verfügbarkeit der EVs in Körperflüssigkeiten wird die Nutzbarkeit als Biomarker intensiv beforscht. Im Falle des Ovarialkarzinoms lassen sich anhand von aus Exosomen isolierten microRNAs erkrankte und gesunde Frauen unterscheiden.⁵⁶ Auch beim PCa etablierte Tumormarker wie *PCA3*, *PSMA* oder *TMPRSS2-ERG* sind in den EVs zu finden.⁷²

Von Zellen des PCa werden Exosomen vermehrt sezerniert, was sich sowohl an einer gesteigerten Exosomenkonzentration im Urin als auch an vermehrten Exosomen mit prostataspezifischen Markern im Blut von PCa-Patienten zeigt.^{73,74} Trotz dieses erhöhten Gehaltes an Exosomen im Urin von Patienten mit PCa konnte dies bisher nicht erfolgreich als Indikator für das Therapieansprechen genutzt werden.⁷⁵

Da Exosomen in der Tumorbilogie eine Rolle spielen und bioaktiv, metabolisch stabil, membrangängig und zu spezifischem Targeting fähig sind,⁵⁷ bieten sie sich auch in der Therapie von Krebserkrankungen an: Einerseits gibt es Ansätze, ihren Effekt durch Modulation der Transmitterwirkung oder Hemmung der Freisetzung zu verringern, auf der anderen Seite wird versucht, sie aufgrund ihrer Bioaktivität und Fähigkeit zu spezifischem Targeting als Transportvehikel für Therapeutika oder als Impfstoff zu verwenden.⁵⁷ So können Exosomen von dendritischen Zellen („Dexosomen“) durch Beeinflussung von T-Zellen eine tumorfeindliche Umgebung zu schaffen,⁷⁶ was bereits in mehreren Phase-I-Studien bei geringem Nebenwirkungsprofil mit gewissem Erfolg angewandt wurde.^{77–79}

1.3 Fragestellung

Exosomen von benignen Prostatazellen besitzen im Gegensatz zu Vesikeln aus Zellen des PCa keine die Erkrankungsprogression begünstigenden Wirkungen.⁶⁵ Die besonderen Effekte der PCa-Exosomen könnten in einer veränderten Beladung aber auch schlicht in einer gesteigerter Sekretion begründet liegen. Beides könnte durch Alterationen der Sekretionsmaschinerie selbst oder ihrer Regulation erklärbar sein.

Ein besseres Verständnis der Rolle der exosomalen Sekretion und ihrer Regulation im PCa könnte dazu beitragen, Mechanismen der Erkrankungsprogression therapeutisch zu beeinflussen oder neue diagnostische Marker zu entwickeln. Daher stellt sich die Fragen:

- (1) Welche an der exosomalen Sekretion beteiligten Gene sind im PCa in ihrer Expression alteriert?
- (2) Gibt es hier Assoziationen mit klinischen oder pathologischen Parametern?

Diese Studie soll zur besseren Charakterisierung der Rolle von mit der exosomalen Sekretion assoziierten Genen im PCa beitragen und damit ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Tumorbilogie ermöglichen. Dies ist notwendig für weitere Fortschritte in der Diagnostik, zur besseren Risikostratifizierung des PCa und um mögliche neue Therapieansätze aufzudecken.

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht zur Vorgehensweise

Dieser Unterabschnitt gibt einen Überblick über das methodische Vorgehen der vorliegenden Arbeit. Für Details sei auf die entsprechenden weiteren Abschnitte verwiesen.

1.) Kandidatensuche: Um zu überprüfen, ob und welche Gene der exosomalen Maschinerie beim PCa eine prognostische Relevanz haben, wurde auf Basis aktueller Literatur ein initiales Panel von mit der exosomalen Sekretion assoziierten Genen zur Untersuchung erstellt (Abb. 2.1 A).

2.) Reduktion der Kandidaten und Auswahl für weitere Untersuchung: Um die Anzahl der Kandidaten zu verringern, wurden existierende Microarray-Daten von Taylor *et al.* (n=169)⁸⁰ re-analysiert, um zu überprüfen, ob die Expression der einzelnen Gene mit der Zeit bis zur BCR, einem Marker für Erkrankungsprogression bzw. -rezidiv nach kurativer Therapie, korreliert (Abb. 2.1 B). Dazu wurden die Patienten für jedes einzelne Gen in Gruppen mit hoher bzw. niedriger Expression eingeteilt und diese mittels Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier und Log-Rang-Tests verglichen. Unter der gewählten Anforderung, dass sich in den jeweiligen Gruppen ≥ 20 Patienten befinden sollten, verblieben acht Gene mit signifikant unterschiedlicher Zeit bis zur BCR ($\alpha \leq 0,05$). Von diesen wurden *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* zur weiteren Untersuchung ausgewählt (Abb. 2.1 B).

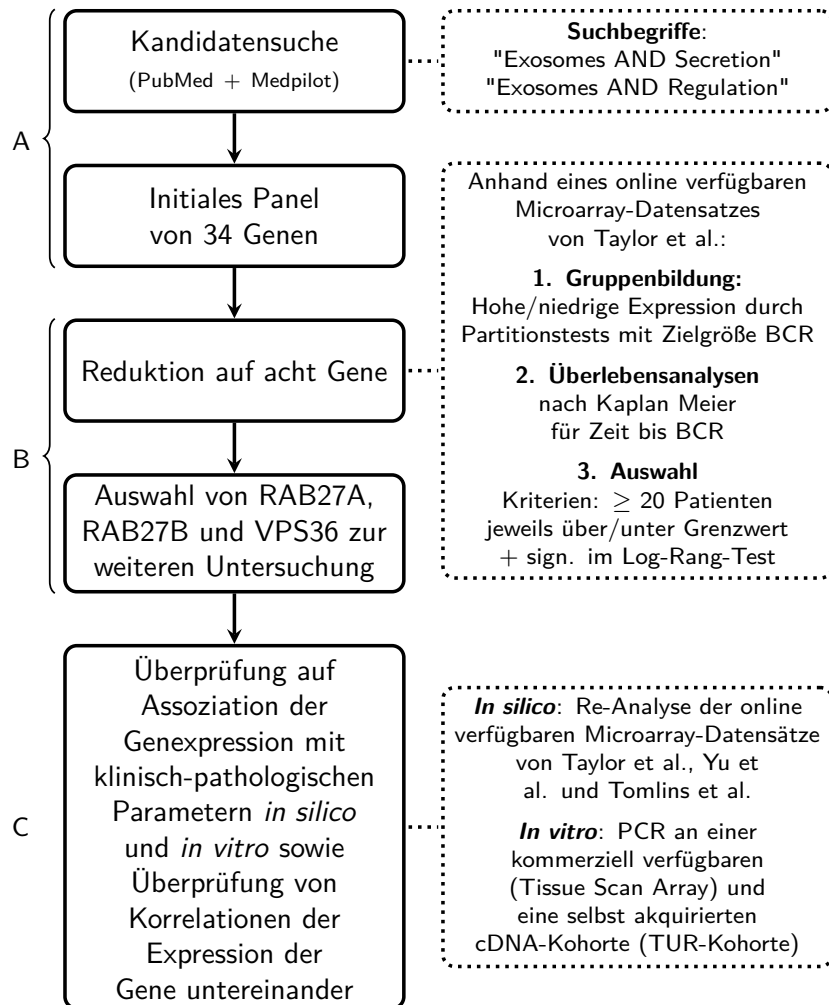


Abbildung 2.1: Studienablauf. Das Schaubild gibt einen Überblick zum Ablauf der vorliegenden Arbeit. Mittels Literaturrecherche wurde ein Panel von Genen zur Evaluation aufgestellt (A), die Gene *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* für die weiteren Untersuchungen ausgewählt (B) und schließlich Assoziationen der Genexpression mit klinisch-pathologischen Parametern anhand existierender Genexpressionsdatensätze und zweier cDNA-Kohorten überprüft. (*BCR*: *Biochemisches Rezidiv*).

3.) Weitere Untersuchungen für *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36*: Um Assoziationen der jeweiligen Genexpression mit klinisch-pathologischen Parametern (Lokalstadium, Differenzierung, Metastasierung) zu überprüfen, wurden *in silico* drei bereits existierende und online verfügbare Microarraydatensätze von Taylor *et al.*, Yu *et al.* und Tomlins *et al.* erneut analysiert. Weiterhin wurde zur Validierung die Genexpression mittels RT-qPCR in zwei cDNA-Kohorten bestimmt: Dem kommerziell verfügbaren OriGene TissueScan™ Array und der selbst akquirierten TUR-Kohorte. Weiterhin wurden die Korrelationen der jeweiligen Genexpressionen untereinander betrachtet. (Abb. 2.1 C).

2.2 Erstellung des Panels von Genen zur Untersuchung

Um ein Panel von Genen, die mit der Sekretion und Regulation von Exosomen assoziiert sind, zu erstellen, wurden bei NCBI PubMed⁸¹ und MEDPILOT⁸² unter Verwendung der Begriffe „exosomes AND release“, „exosomes AND secretion“ und „exosomes AND regulation“ wissenschaftliche Veröffentlichungen akquiriert. Anhand der gefundenen Abstracts wurden nutzbare Publikationen ausgewählt und gemeinsam mit einigen Referenzen der jeweiligen Arbeiten nach entsprechenden Genen durchsucht. Auswahlkriterium war eine Assoziation mit der Sekretion von Exosomen. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.1 ab S. 34 zusammengefasst.

2.3 Kohorten: *In silico*

Zur Auswahl von Kandidatengenen zur genaueren Untersuchung und um anschließend den Einfluss der ausgewählten Gene (*RAB27A*, *RAB27B*, *VPS36*) auf verschiedene Parameter zu überprüfen, wurden *in silico* drei online verfügbare Microarray-Datensätze *re*-analysiert und zur Validierung die Genexpression in zwei cDNA-Kohorten mittels RT-qPCR bestimmt. Die Daten von Taylor *et al.* wurden bei *cBioPortal* (Memorial Sloan Kettering Cancer Center)^{83,84} bezogen, die beiden weiteren bei *NCBI GEO*.⁸⁵

Zur besseren Übersicht und Orientierung werden den Datensätzen in dieser Arbeit zusätzlich zu den zugehörigen Publikations-Autoren die Bezeichner DS1, DS2 und DS3 angegeben: Taylor et al. (DS1), Yu et al. (DS2), Tomlins et al (DS3).

Taylor *et al.* (DS1) erstellten ihren Datensatz für ein genomisches Profiling des PCa und er bietet Expressionsdaten von vielen lokalisierten, einigen lokal fortgeschrittenen PCa und aus Metastasen. Yu *et al.* (DS2) nutzten ihren Datensatz primär zum Vergleich zwischen primären und metastatischen PCa und er enthält entsprechend viele metastatische Proben. Tomlins *et al.* (DS3) stellten ihre Kohorte zur Untersuchung der Progression des PCa zusammen und der Datensatz enthält Varianten benigner Proben, lokalisierte PCa und metastatische Proben.

In den drei folgenden Abschnitten sind genauere Informationen zu den Datensätzen und der jeweiligen Probenzusammensetzung angegeben.

2.3.1 Taylor *et al.* (DS1): Lokalisierte, lokal fortgeschrittene PCa und Metastasen

- Plattformen: Agilent-014693 Human Genome CGH Microarray 244A (Feature number version), Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array (probe set (exon) version), Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array
- Zusammensetzung der Kohorte (siehe auch Abb. 2.2 a-c auf S. 20)
 - Anzahl Proben: benigne: 29, PCa: 131, Metastasen: 19
 - Alter: $58,3 \pm 7,04$ Jahre
 - Gleason: 6: 41, 7: 76, 8: 11, 9: 11
 - T-Stadium: T2: 86, T3: 47, T4: 8
- Datenformat
 - Für Überlebensanalysen wurden die mRNA-Expressions-Daten als „Z-Score vs normals“ mit einem Z-Score threshold von 2 bei cBioPortal exportiert
 - Für die Gruppenvergleiche wurden die Expressions-Rohdaten bei NCBI GEO bezogen und in relative Expressionen umgerechnet (siehe S. 24)

- Gruppierungen: Nach Gewebeart (benigne, PCa und Metastasen), lokalem Tumorstadium (T-Stadium) und Differenzierungsgrad (Grading nach Gleason)
- Referenz: Taylor *et al.* (2010), *Cancer Cell* ⁸⁰
- Verfügbar bei cBioPortal unter www.cbioportal.org/study.do?cancer_study_id=prad_mskcc (Zugriff am 23.06.2014) und bei NCBI GEO unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE21032> (Zugriff am 28.08.2016)

2.3.2 Yu *et al.* (DS2): Primäre PCa und Metastasen

- Plattform: Affymetrix Human Genome U95C Array
- Zusammensetzung der Kohorte (siehe dazu auch Abb. 2.2 d-f auf S. 20)
 - Anzahl Proben: Normal: 17, angrenzendes Normalgewebe: 58, PCa: 64, Metastasen: 25
 - Gleason: 4: 1, 5: 2, 6: 15, 7: 28, 8: 7, 9: 11
 - T-Stadium: T2: 25, T3: 37, T4: 2
- Datenformat: Rohdaten als Zähler; für die Auswertung in relative Expression umgerechnet (siehe S. 24)
- Gruppierungen: Gewebeart (Normal (benigne), angrenzendes Normalgewebe, PCa, Metastase), lokalem Tumorstadium (T-Stadium) und Grading nach Gleason
- Verwendete Sonden: *RAB27A*: 55539_at und 65080_r_at. *RAB27B*: 64163_at und 64838_at. *VPS36*: 64932_at und 61752_at
- Referenzen: Yu *et al.* (2004), *Journal of clinical oncology*,⁸⁶ Chandran *et al.* (2007), *BMC cancer* ⁸⁷
- Verfügbar unter: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser?acc=GDS2547 (Zugriff am 25.04.2014)

2.3.3 Tomlins *et al.* (DS3): Lokalisierte PCa und Metastasen

- Plattform: Chinnaiyan Human 20K Hs6
- Zusammensetzung der Kohorte (siehe dazu auch Abb. 2.2 g-h auf S. 20)
 - Anzahl Proben: Benigne: 22; PCa: 32; Metastasen: 20
 - Gleason: 6: 10, 7: 8, 8: 7, 9: 7
- Datenformat: Log2-Ratios, für die Auswertung in relative Expression umgerechnet (siehe S. 24)
- Gruppierungen:
 - Gewebeart (in Klammern sind die Bezeichner des Datensatzes angegeben)
 - * Benignes Prostatagewebe (EPI_ADJ_PCA, EPI_BPH, EPI_NOR)
 - * PCa-Gewebe (PCa)
 - * Gewebe von PCa-Metastasen (MET_HR)
 - Grading nach Gleason
- Verwendete Sonden: *RAB27A*: Hs6-21-9-17. *RAB27B*: Hs6-25-17-13. *VPS36*: Hs6-4-5-16, Hs6-6-21-22 und Hs6-24-7-19
- Referenz: Tomlins *et al.* (2007), *Nature genetics* ⁸⁸
- Verfügbar unter: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser?acc=GDS3289
(Zugriff am 25.04.2014)

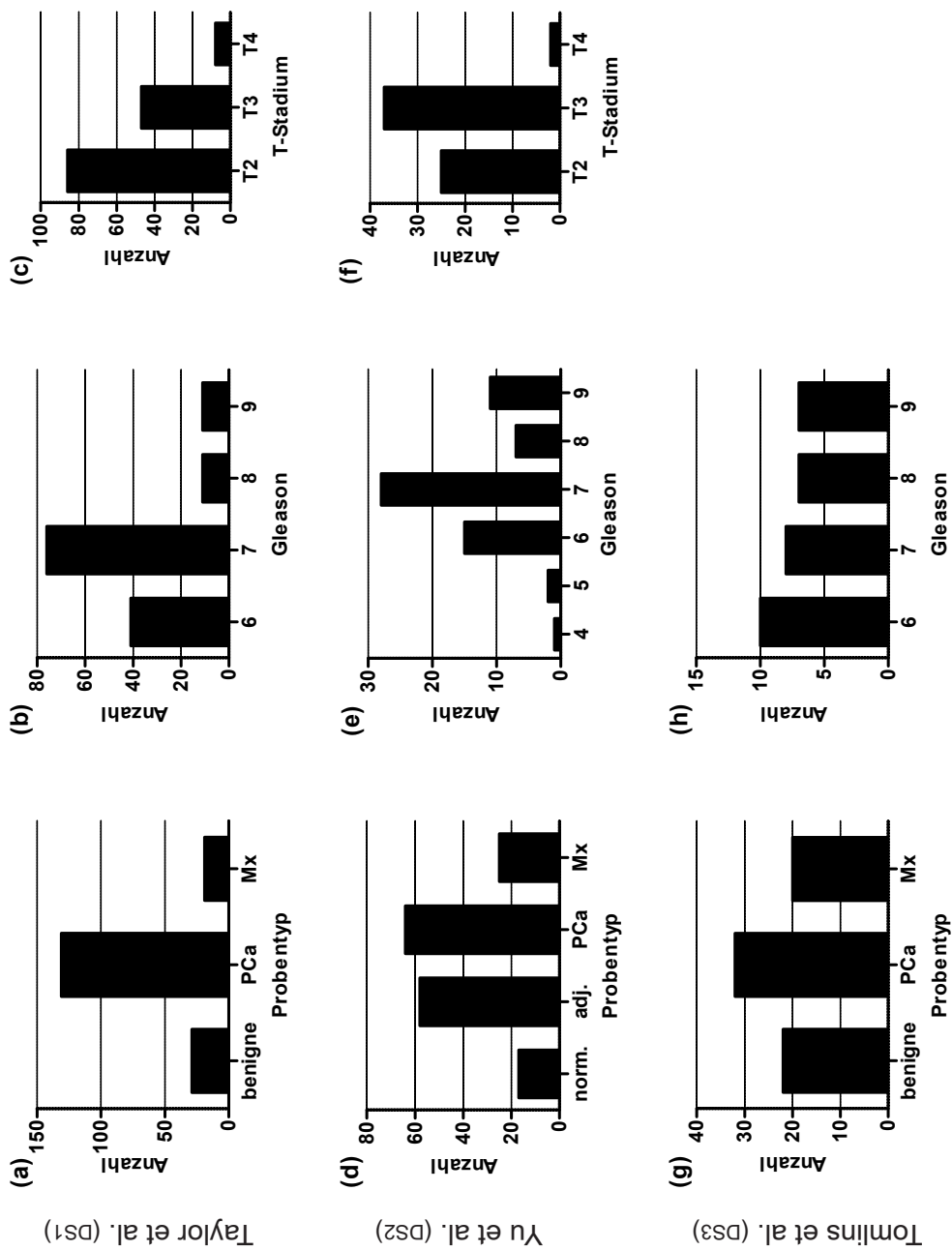


Abbildung 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Microarraydatensätze: Verteilung von Probenotypen, Gleason und T-Stadium. Die Abbildungen zeigen jeweils die Verteilung der verschiedenen Probenotypen, des Gratings nach Gleason und des T-Stadiums in den Microarray-Datensätzen von Taylor *et al.* (DS1)⁸⁰ (a-c), Yu *et al.* (DS2)⁸⁶ (d-e) und Tomlins *et al.* (DS3)⁸⁸ (g,h). Bei Tomlins *et al.* (DS3) fehlten Angaben zum T-Stadium. *PCa*: Prostatakarzinom, *Mx*: Metastasen; *norm.*: Normales Prostatagewebe; *adj.*: benignes Prostatagewebe in Nachbarschaft eines *PCa*.

2.4 Kohorten: Quantitative PCR (cDNA)

2.4.1 TUR-Kohorte

Das Material der TUR-Kohorte stammte von Patienten, bei denen bei bestehendem PCa bzw. BPH eine TUR-P durchgeführt wurde. Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben wurden folgendermaßen ausgewählt und bezogen:

1. Suche nach Fällen mit der Prozedur OPS 5-601 (Transurethrale Exzision und Destruktion von Prostatagewebe) im Krankenhausinformationssystem der Universitätsmedizin Mannheim (SAP GUI for Windows Version 7400.1.0.1093; SAP SE, Walldorf, Deutschland).
2. Durchsicht der archivierten Arztbriefe und der zugehörigen Pathologiebefunde nach klinischen Daten
3. Selektion von Patienten mit TUR-P, die an BPH oder einem PCa leiden
4. Auswahl derjenigen Proben der Patienten mit PCa, die Tumorgewebe enthalten
5. Abholung der Proben aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim
6. Selektion von brauchbaren Proben durch mikroskopische Evaluation der mit Hämatoxilin und Eosin gefärbten Schnitte, ob und wie viel Tumorgewebe tatsächlich enthalten ist und wie vital der Tumor ist.
7. Anfertigung von jeweils mehreren 10 µm dicken Schnitten mit vorausgehenden und folgenden 3 µm dicken Schnitten zur HE-Färbung (zur erneuten Beurteilung der ausgewählten Paraffin-Blöcke)
8. Weitere Verarbeitung wie in Abschnitt 2.9 ab S. 28 geschildert

Die resultierende TUR-Kohorte umfasste 39 Patienten mit PCa und 10 Patienten mit BPH. Die genauere Zusammensetzung ist im Folgenden geschildert:

- **Gesamt:** 59 Proben von 49 Patienten (bei 8 Patienten lagen mehrere Proben vor.)
 - Hormontherapie-sensitiv: 36/59 (61,0%) von 26/49 Patienten (53,1%)
 - Hormontherapie-refraktär: 13/59 (23,0%) von 13/49 Patienten (26,5%)
 - Proben mit BPH: 10/59 (16,9%) von 10/49 Patienten (20,4%)

- **Grading nach Gleason:** Bei 10 Proben bekannt, die Verteilung ist in Abb. 2.3d dargestellt.
- **Alter bei Diagnose:** Erstdiagnose bei 24 Patienten bekannt; das Alter ist wie in Abbildung 2.3c verteilt.
 - Mittel bei Hormonnativen Patienten: 73,9 Jahre
 - Mittel bei Hormonrefraktären Patienten: 76,0 Jahre
 - Mittel bei BPH-Patienten: 66,9 Jahre
- **Überlebensdaten:** Bei 14 Patienten konnte eine Überlebensabfrage durchgeführt werden. Davon waren sieben zum Zeitpunkt der Abfrage verstorben.

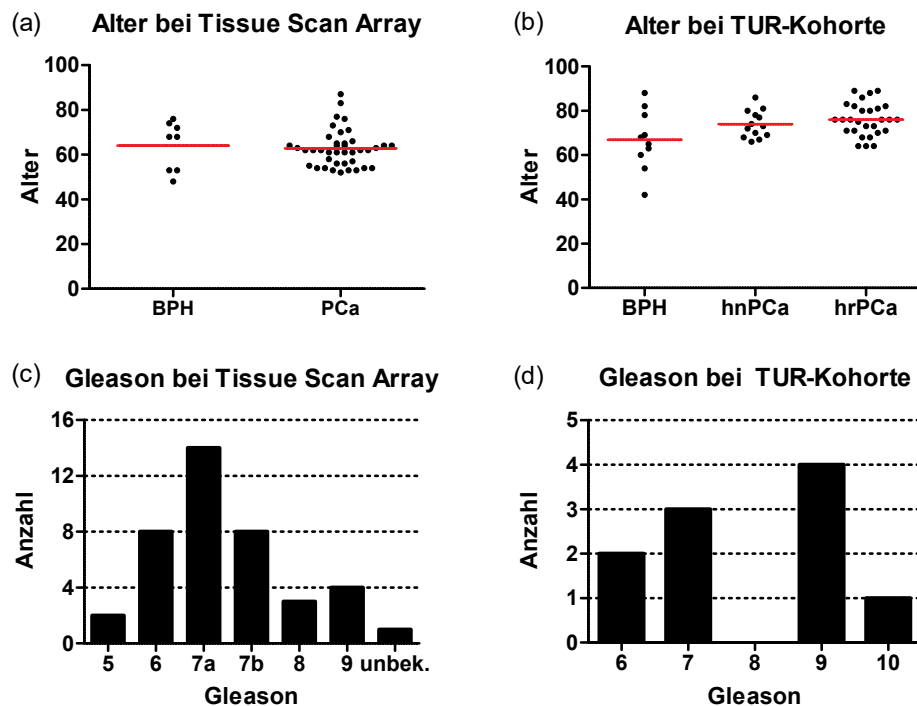


Abbildung 2.3: Zusammensetzung der verwendeten cDNA-Kohorten: Verteilung von Alter und Grading nach Gleason. *TUR-Kohorte:* Vor Ort akquirierte Kohorte von Proben aus TUR-Ps bei Prostatakarzinom, *Tissue Scan Array:* OriGene TissueScan™ (Prostate Cancer cDNA Array II (HPRT102), *BPH:* Benigne Prostatahyperplasie, *PCa:* Prostatakarzinom, *hnPCa:* PCa ohne Androgendeprivationstherapie, *hrPCa:* PCa mit Z.n. Androgendeprivationstherapie.

Die retrospektive Untersuchung von Patientenmaterial sowie die Auswertung der klinischen Daten für diese Studie wurde durch das Votum der medizinischen Ethik-Kommission II der Universität Heidelberg befürwortet (Antrag 2013-845R-MA).

2.4.2 Tissue Scan Array

Zur Untersuchung von Unterschieden in der Expression von RAB27A, RAB27B und VPS36 in Abhängigkeit von Tumorstadium, Gleason und für einen Vergleich zwischen Normal- und Tumorgewebe wurden mit cDNA gespottete *OriGene Tissue ScanTM Prostate Cancer cDNA Array II (HPRT102)* (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD, USA) verwendet. Diese bieten Material von 48 Patienten im Alter von $62,9 \pm 8,5$ Jahren. Die Samples wurden jeweils mittels qPCR in Duplikaten untersucht.

- **Zusammensetzung der Kohorte** (siehe auch Abb. 2.3 c)
 - Anzahl Gesamt: 48, BPH: 8; lokalisierte PCa: 40
 - Gleason: 6: 2, 7: 3, 9: 4, 10: 1
 - T-Stadium: T2: 22, T3: 12, Unbekannt: 6
- **Altersverteilung** (siehe auch Abbildung 2.3 a)
 - Lokalisiertes PCa: 62.75 ± 8.15 Jahre
 - BPH: 64.15 ± 10.9 Jahre

2.5 Selektion von Kandidatengenomen anhand von Microarray-Daten

Um aus dem wie in Abschnitt 2.2 geschildert erstellten Panel von mit der Sekretion von Exosomen assoziierten Genen Kandidaten für die weitere Untersuchung auszuwählen, wurde im Datensatz von Taylor *et al.* (DS1) untersucht, ob die Expression mit der Zeit bis zum BCR korreliert. Dazu wurden in SAS JMP 11[®] (SAS Institute, Cary, NC, USA) für jeweiligen Gene Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier mit Log-Rang-Tests durchgeführt. Die den Gruppierungen zugrunde liegenden Expressions-Cutoff-Werte wurde

ebenfalls in SAS JMP 11[®] mittels Partitionierungen bestimmt. Als Zielgrößen wurde hier das BCR und als Faktor die Expression der jeweiligen Gene verwendet.

Für die weitere Analyse wurden nur Gene ausgewählt, die für die Sekretion von Exosomen relevant sind, bei denen jeweils mindestens 20 Patienten ober- und unterhalb des bestimmten Cutoff-Wertes lagen und für die der Log-Rang-Test signifikant ausfiel.

2.6 Berechnung relativer Genexpressionen in Microarray-Datensätzen

Um die Messwerte der Microarray-Datensätze besser vergleichen zu können, wurden die bei NCBI GEO⁸⁵ bezogenen Werte noch einmal folgendermaßen verarbeitet (siehe auch Abb. 2.4):

Bei Yu *et al.* (DS2) wurden die einzelnen Expressionswerte, die als „Counts“ vorliegen, auf das gestutzte Mittel (mittlere 96%) aller Expressionswerte des jeweiligen Gens normalisiert und die relative Expression im Verhältnis zum Median der benignen Proben berechnet. Die Werte der teilweise pro Gen mehrfach vorhandenen Sonden wurden anschließend gemittelt.

Bei Taylor *et al.* (DS1) und Tomlins *et al.* (DS3) wurden die bezogenen, logarithmierten Werte zunächst zur Basis zwei entlogarithmiert und anschließend die Expression relativ zum Median der benignen Proben berechnet. Die Werte der bei Tomlins *et al.* (DS3) für VPS36 mehrfach vorliegenden Sonden wurden anschließend gemittelt.

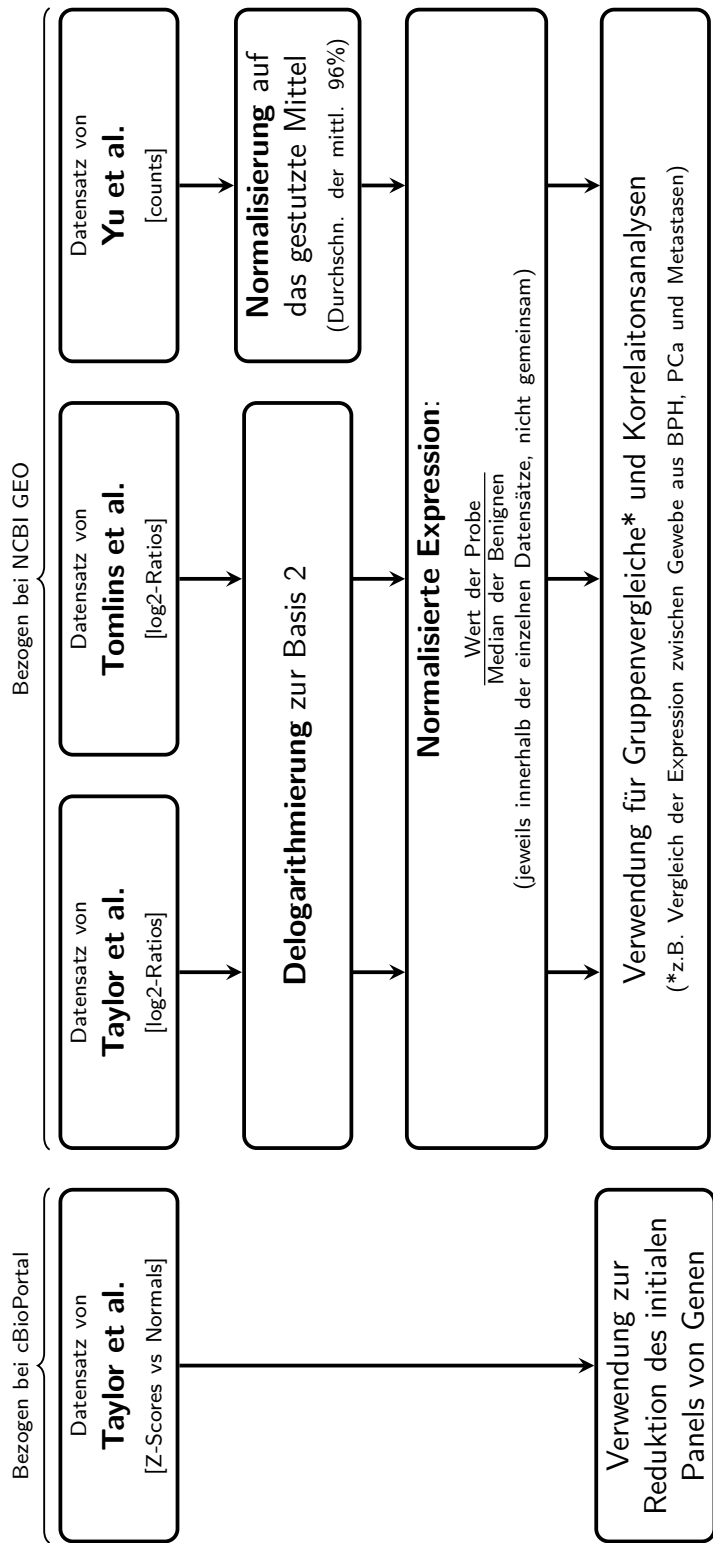


Abbildung 2.4: Berechnung relativer Expressionen für präexistierende Genexpressions-Datensätze. Schema zur Vorgehensweise bei der Berechnung relativer Expressionen für die verwendeten, online verfügbaren Datensätze von Taylor *et al.* (DS1), Yu *et al.* (DS2) und Tomlins *et al.* (DS3). (*BPH*: Benigne Prostatatahyperplasie, *PCa*: Prostatakarzinom)

2.7 Gruppenvergleiche *in silico* und in cDNA-Kohorten

Um einen möglichen Einfluss der wie in Abschnitt 2.5 beschrieben ausgewählten Gene auf klinisch-pathologische Parameter (Malignität, Lokalstadium, Differenzierung, Metastasierung) des PCa zu überprüfen wurden die *in silico* akquirierten und die aus Tissue Scan Array und TUR-Kohorte gewonnen Daten mittels Gruppenvergleichen analysiert. Hierbei wurde jeweils nach Gewebeart (benigne, PCa, Metastase), lokalem Tumorstadium (T-Stadium), Grading nach Gleason und Hormontherapiestatus gruppiert und anschließend verglichen.

Da die Werte aller Datensätze zumindest in einzelnen Kategorien nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt waren ($\alpha \leq 0,05$), wurden nonparametrische Tests zum Vergleich der jeweiligen Gruppen verwendet: Bei Vorliegen von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt, bei mehr als drei der Kruskal-Wallis-Test, an den sich bei signifikantem Ergebnis ($\alpha \leq 0,05$) zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander noch Posthoc-Tests nach Dunn anschlossen ($\alpha \leq 0,05$).

2.8 Primer und Sonden

Für *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* wurden jeweils vier Primerpaare entworfen. Zwei Paare für *RAB27A* wurden manuell anhand der entsprechenden cDNA-Information von Ensembl.org^{89–91} erstellt, die restlichen Primer wurden mittels NCBI Primer-BLAST angelegt.^{92,93} Dabei wurden die Standardeinstellungen von Primer BLAST verwendet und von den gelieferten Sequenzen diejenigen ausgewählt, bei denen das PCR-Produkt eine Exon-Grenze überspannt, um eine spezifische Amplifikation umgeschriebener mRNA zu erreichen, ohne dabei genomische DNA zu amplifizieren. Die Primer und Sonden wurden bei MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Die Spezifität und Funktionalität der Primer wurde mittels SYBER-GREEN-qPCR überprüft. Als Template wurde jeweils cDNA von PC3-Zelllysaten verwendet und anhand der Schmelzkurven für jedes Gen ein Primerpaar für die weitere Verwendung ausgewählt.

Die PCR-Performance wurde mittels einer cDNA-Verdünnungsreihe von PC3-Zell-Lysat überprüft.

Für die ausgewählten Primerpaare wurden manuell, vom vorwärts-Primer einige Basen entfernte, qPCR-Sonden mit einer Schmelztemperatur (T_m) von ca. 70°C entworfen und die PCR-Performance ebenfalls mittels cDNA-Verdünnungsreihen von PC3-Zell-Lysat evaluiert. Die Intraassay-Variation wurde anhand von zehn Replikaten jeweils 1:10 und 1:100 verdünnter cDNA des PC3-Zell-Lysates beurteilt. Als Housekeeping-Gen wurde im Rahmen des Designs der Primer und Sonden *GUS* verwendet.

Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 2.1 und 2.2 zusammengefasst.

| Bezeichnung | Sequenz | T_m [°C] |
|----------------|--------------------------------|------------|
| RAB27A_2.2_e5F | GCCATAGCAC TCGCAGAGAA | 60,2 |
| RAB27A_2.2_e6R | AATGGAACGG TGTGTGGACA | 59,8 |
| RAB27B_1.5_e3F | ATGCACAAGG ACCGAATGGA | 59,7 |
| RAB27B_1.5_e4R | GTTCCGGAGT CTCACCCTG | 60,0 |
| VPS36_1.3_e10F | AAACCGAGCT CGAGGAATGG | 59,4 |
| VPS36_1.2_e12R | GTGTGTTTGA CAGTGGCGTC | 65,0 |
| AR_E_2F1 | CTTTCCACCC CAGAAGACCTG | 59,6 |
| AR_E_3R1 | CTTCTGTTTC CCTTCAGCGGC | 61,1 |
| MP501-Calm-F | TGTGGTTCCT GCATGAAGACA | 61,4 |
| MP501-Calm-R | AGTCAGTTGG TCAGCCATGCT | 59,8 |
| ENF1102M (GUS) | GAAAATAYRTGGT TGGAGAGCTCATT | 55,4 |
| ENR1162 (GUS) | CCGAGTGAAGA TCCCCTTTTTA | 56,0 |

Tabelle 2.1: Verwendete Primer.
(T_m : Schmelztemperatur)

| Bezeichnung | Sequenz | T _m [°C] | 5'-Label | 3'-Label |
|---------------|--|---------------------|----------|----------|
| RAB27A_2.2_p1 | CTACTTTGAAACTAG TGCTGCCAATGGGAC | 69,0 | FAM | BHQ2 |
| RAB27B_1.5_p1 | CAGGGAAAGCATTTA AAGTGCATCTTCAGC | 69,0 | FAM | BHQ2 |
| VPS36_1.3_p1 | TGCTCTCACCAGAAG ATTTAGTGAATGCGT | 70,0 | FAM | BHQ2 |
| AR_E2_P | TTCTGGGTGTCACTATG GAGCTCTCACATGTGGA | 70,7 | FAM | BHQ2 |
| MP501-Calm-P | TCGCGTCTCGG AAACCGGTAGC | 65,8 | YAK | BHQ2 |
| ENP1142 (GUS) | CCAGCACTCTCGT CGGTGACTGTTCA | 68,0 | YAK | BHQ2 |

Tabelle 2.2: Verwendete PCR-Sonden.
(T_m: Schmelztemperatur).

2.9 RNA-Isolation

RNA-Isolation aus FFPE-Material

Zur Isolation von RNA aus den FFPE-Proben der TUR-Kohorte wurde das XTRAKT FFPE Kit® (Stratifyer Molecular Pathology GmbH, Köln) gemäß den Herstellervorgaben verwendet. Dabei wird die RNA an ferromagnetische Partikel gebunden und bis zur Eluierung während mehrerer Waschschriffe mittels eines Magneten fixiert.

Von den, wie in Abschnitt 2.4.1 geschildert ausgewählten, FFPE-Proben-Blöcken der TUR-Kohorte wurden mit einem Mikrotom (Fa. Walldorf) 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und die Tumorareale markiert. Bei einem Tumoranteil von > 80% und bei den benignen Kontrollen wurde der Schnitt vollständig verwendet, bei < 80 % wurden die nicht erwünschten Gebiete mit einem sterilen Skalpell vom Objektträger abgeschabt. Zur erleichterten Verarbeitung wurden die Objektträger drei mal 2 Minuten in NeoClear® (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) entparaffiniert. Anschließend wurde das Gewebe mit einem sterilen Skalpell in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß mit 150 µl Lysepuffer überführt und zur vollständigen Durchmischung und Auflösung des Gewebes 30 Minuten bei 80°C und Schütteln mit 1200 rpm inkubiert. Als nächstes wurde auf 65°C abgekühlt und zur Inaktivierung der enthaltenen Nukleasen 50 µl Proteinase K (Promega, Fitchburg, WI, USA) hinzugegeben. Nach dreißigminü-

tiger Inkubation bei 65°C und 1200 rpm Schütteln wurden 800 µl MagiX-RNA und nach ausgiebigem Mischen der Vorrats-Lösung je 40 µl MagiX-Bead RNA hinzugegeben. Anschließend wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur und 1200 rpm Schütteln inkubiert und danach die Flüssigkeit unter Magnetisierung aspiriert. Zur Aufreinigung wurde drei Mal mit verschiedenen Lösungen gewaschen wobei die Waschlösung jeweils unter Magnetisierung abpipettiert wurde.

Um die RNA von den Metallpartikeln zu eluieren wurde abschließend 100 µl RNA-Elutionspuffer zugegeben, 15 Minuten bei 70°C inkubiert und das Eluat unter Magnetisierung abgezogen. Die entstandene RNA-Lösung wurde entweder direkt verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

RNA-Quantifizierung

Zur photometrischen Quantifizierung der in den Proben enthaltenen RNA wurde ein NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Dabei wurden jeweils 1,5 µl Probenvolumen eingesetzt, bei 260 nm photometrisch vermessen und zur Qualitätskontrolle das Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und 280 nm bestimmt; dieses sollte nahe 2,0 liegen.

2.10 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Zur Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA wurde für die FFPE-Proben der TUR-Kohorte SuperScript® III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Um die RNA spezifisch umzuschreiben, wurden dabei sequenzspezifische Primer eingesetzt. Dafür wurden maximal 5 Primer zu gleichen Teilen eingesetzt und bei Verwendung von weniger Primern das Volumen der fehlenden Primer durch nukleasefreies Wasser ersetzt.

Um die RNA zu denaturieren wurde der in Tabelle 2.3 beschriebene Ansatz für zehn Minuten bei 65°C inkubiert und danach eine Minute auf Eis abgekühlt. Für die Synthese selbst wurden jedem Ansatz 8 µl vom in Tabelle 2.4 geschilderten Mastermix zugegeben, in einem Thermocycler (Flexcycler², Analytik Jena AG, Jena) 120 Minuten bei 55°C

inkubiert und zur Inaktivierung der Enzyme anschließend für 15 Minuten auf 70°C erhitzt. Das Produkt wurde als nächstes entweder direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

| Substanz | Menge [µl] |
|-----------------------|------------|
| RNA-Template | 5 |
| Primermix | 2,5 |
| 10mM dNTP Mix | 1 |
| Nukleasefreies Wasser | 3,5 |

Tabelle 2.3: cDNA-Synthese-*Ansatz* für SuperScript-III
(Angaben für einen einzelnen Ansatz von insg. 20 µl)

| Substanz | Menge [µl] |
|------------------------------|------------|
| 5x First Strand - Buffer | 4 |
| 0,1 M DDT | 1 |
| RNaseOUT | 1 |
| Superscript III RT (200U/µl) | 2 |

Tabelle 2.4: cDNA-Synthese-*Mastermix* für SuperScript-III
(Angaben für einen einzelnen Ansatz von von insg. 20 µl)

2.11 Quantitative PCR

PCR mit SYBER-Green

Quantitative PCR (qPCR) mit SYBER-Green wurde mit dem in Tabelle 2.5 geschilderten Ansatz (Fast SYBR green Master Mix von ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)) in einem Taqman StepOnePlus™ (Waltham, MA, USA) durchgeführt. Als Reaktionszyklus wurde der folgende Ablauf mit abschließender Schmelzkurvenanalyse verwendet (Fast Protokoll auf Taqman StepOnePlus™): Einmalig 20 Sekunden 95°C, dann 50 Zyklen mit jeweils 3 Sekunden 95°C und 30 Sekunden 60°C.

PCR mit Soden

Die PCR mit Sonden wurde mit dem in Tabelle 2.6 geschilderten Versuchsansatz in einem Taqman StepOnePlus™ unter Verwendung des TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Als Reaktionszyklus wurde der folgende Ablauf verwendet (Fast Protokoll auf Taqman StepOnePlus™): 20 Sekunden 95°C , dann 50 Zyklen mit jeweils 3 Sekunden 95°C und 30 Sekunden 60°C.

| Substanz | Menge [µl] |
|----------------------------|------------|
| Fast SYBR green Master Mix | 10 |
| Nukleasefreies Wasser | 6,5 |
| Vorwärts-Primer | 0,75 |
| Rückwärts-Primer | 0,75 |
| Template (1:10 verd.) | 2 |
| Gesamtvolumen | 20 |

Tabelle 2.5: Versuchsansatz für qPCR mit SYBER-green

| Substanz | Menge [µl] |
|---|------------|
| TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase UNG | 10 |
| Nukleasefreies Wasser | 6,5 |
| Vorwärts-Primer | 0,75 |
| Rückwärts-Primer | 0,75 |
| Sonde | 0,5 |
| Template | 2 |
| Gesamtvolumen | 20 |

Tabelle 2.6: Versuchsansatz für qPCR mit Sonden

Berechnungsgrundlagen und Auswertung

Nach Livak *et al.*⁹⁴ wurden die relativen Quantitäten (RQ) der quantitativen PCR anhand der folgenden Vorgehensweise ausgewertet:

$$\begin{aligned}\Delta C_{T,q} &= C_{T,target} - C_{T,R} \\ \Delta\Delta C_{T,target} &= \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb} \\ RQ &= 2^{-\Delta\Delta C_{T,target}}\end{aligned}$$

C_T : Anzahl der Zyklen bis zum Erreichen eines festgelegten Grenzwertes an Nukleinsäuren bzw. Signal.

q : Untersuchtes Probe. $target$: Zielgen. R : Interne Kontrolle (Houskeeping-Gen).

cb : Kalibrator-Probe bzw. Kalibrator-Wert. RQ : Menge des Zielgens normalisiert auf die interne Kontrolle relativ zum Kalibrator.

Als interne Kontrollen (Housekeeping-Gene) wurden beim Tissue Scan Array Glucurodinase (*GUS*) und bei der TUR-Kohorte Calmodulin (*CALM2*) eingesetzt.

2.12 Überlebensabfrage

Für die Überlebensabfrage der Patienten der TUR-Kohorte wurde durch die Tumordokumentationsstelle der Universitätsmedizin Mannheim eine Abfrage bei den jeweils zuständigen Einwohnermeldeämtern der in Baden-Württemberg wohnhaften Patienten durchgeführt. Zusätzlich wurden die digitalen Patientenakten im Krankenhaus-Informationssystem (SAP GUI for Windows Version 7400.1.0.1093 (SAP SE, Walldorf, Deutschland)) nach Hinweisen auf den Tod von Patienten durchsucht.

2.13 Statistische Auswertung

Die Überlebens-Analysen wurden mit SAS JMP 11[®] (SAS Institute, Cary, NC, USA) angefertigt, die Gruppenvergleiche in IBM[®] SPSS[®] 24 (IBM Corporation, Armonk, New York, U.S.). Zur Erstellung von Abbildungen wurde GraphPad Prism 5[®] (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) verwendet.

Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen. In den Abbildungen sind statistisch signifikante Ergebnisse mit Sternchen folgendermaßen markiert:

*: $p = 0,010$ bis $0,050$

** : $p = 0,001$ bis $0,010$

* * *: $p < 0,001$

Details zu den im einzelnen verwendeten Tests sind in den Abs. 2.5 und 2.7 angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von Kandidatengenen

Initial wurde ein Panel von 34 mit der Freisetzung von Exosomen assoziierten und sieben bereits als im PCa verändert bekannten Genen erstellt (Siehe Tabelle 3.1 auf S. 36). Anschließend wurden Grenzwerte für die Expression der einzelnen Gene bestimmt, indem unter Verwendung der Daten von Taylor *et al.* (DS1) die Expression der einzelnen Gene in SAS JMP® mit BCR als Zielgröße partitioniert wurde. Darauf aufbauend wurden Überlebensanalysen nach Kaplan Meier und Log-Rang-Tests für die Zeit bis zur BCR durchgeführt. *TMPRSSERG*, *VPS37*, *MVB12*, *CHMP6*, *VLA-4*, *RAB11*, *Flottilin-1* und *Flottilin-2* konnten dabei nicht weiter verfolgt werden, da sie im Datensatz von Taylor *et al.* (DS1) nicht enthalten waren.

Für 22 Gene zeigte der Log-Rang-Test zwischen den Gruppen unter- und oberhalb des Grenzwertes eine signifikant unterschiedliche Zeit bis zur BCR (siehe Tab. 3.2 auf S. 38). Mit der Anforderung, dass die jeweiligen Gruppen ober- und unterhalb des Grenzwertes mindestens 20 Patienten enthalten sollten, verblieben acht Gene: Die bereits als im PCa relevant bekannten Gene *PTEN* und *EZH2*, exosomale Marker wie *CD9* und *HSP70* (*HSP4A*) sowie die mit der exosomalen Sekretion assoziierte Gene *RAB27A*, *RAB27B*, *VPS36* und *VPS4A* (siehe Abb. 3.1 auf S. 37; eine vollständige Übersicht aller Kaplan-Meier-Graphen ist im Anhang ab S. 97 in Abb. 5.1 zu finden). Bei *CD9* ($p=0,007$) und *EZH2* ($p=0,027$) war eine *höhere* Expression mit einer kürzeren Zeit bis BCR assoziiert. *HSP4A* ($p=0,009$), *PTEN* ($p=0,001$), *RAB27A* ($p=0,033$), *RAB27B* ($p=0,022$), *VPS36* ($p=0,005$) und *VPS4A* ($p=0,017$) zeigten jeweils bei *niedrigerer* Genexpression eine statistisch signifikant kürzere Zeit bis BCR.

RAB27A und *RAB27B* sind als zentrale Schaltstellen der exosomalen Sekretion aus MVBs bekannt.⁵³ *VPS36* ist als Teil des ESCRT-II an der Genese von MVBs beteiligt.⁹⁵ Da die Rollen aller drei Gene im PCa bislang unbekannt sind und sich ein signifikant schlechteres Outcome bei Unterexpression zeigte, wurden diese Gene für die weitere Analyse ausgewählt. *VPSA4* wurde nicht weiter verfolgt, da in der Gruppe mit einer Expression $> 0,39$ nur ein einzelnes BCR-Event vorlag.

| Gruppe | Symbol | Name | Referenzen |
|--|------------------|--|----------------|
| Bekannte, im PCa alterierte Gene | AMACR | Alpha-Methylacyl-CoA Racemase | [96] |
| | AR | Androgen-Rezeptor | [97] |
| | EZH2 | Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit | [98] |
| | PCA3 | Prostate cancer antigen 3 | [26, 99, 100] |
| | KLK3 (PSA) | Kallikrein 3 (PSA) | [19] |
| | FOLH1 (PSMA) | Folate hydroxylase 1 (PSMA) | [101, 102] |
| | PTEN | Phosphatase and tensin homolog | [103] |
| | TMPRSS-ERG* | Fusionsgen aus TMPRSS und ERG | [104] |
| ESCRT-I | TSG101 | Tumor susceptibility gene 101 | [105, 106] |
| | VPS28 | VPS28, ESCRT-I subunit | [106] |
| | VPS37* | VPS37, ESCRT-I subunit | [107] |
| | MVB12* | Multivesicular body subunit 12 | [108] |
| | UBAP1 | Ubiquitin associated protein 1 | [109] |
| | ALIX (PDCD6IP) | Programmed cell death 6 interacting protein | [110] |
| ESCRT-II | SNF8 (EAP30) | SNF8, ESCRT-II complex subunit | [95] |
| | VPS25 (EAP20) | Vacuolar protein sorting 25 homolog | [95] |
| | VPS36 (EAP45) | Vacuolar protein sorting 36 homolog | [95] |
| ESCRT-III | CHMP6* | Charged multivesicular body protein 6 | [111] |
| | IST1 | IST1, ESCRT-III associated factor | [111] |
| | VPS4A | Vacuolar protein sorting 4 homolog A | [112, 113] |
| | VTG1 (LIP5) | Vesicle trafficking 1 | [111] |
| Weitere, Exosomen- Assoziierte Gene | CD9 | CD9 Molekül | [101] |
| | CD63 | CD63 Molekül | [101, 114] |
| | CD81 | CD81 Molekül | [47] |
| | HSP90 (HSP90AA1) | HSP 90 alpha family class A member 1 | [115] |
| | HSPA4 (HSP70) | HSP family A (Hsp70) member 4 | [55, 115] |
| | DCT (TYRP2) | Dopachrome tautomerase | [55] |
| | VLA-4* | Very late Antigen-4 | [55] |
| Rab-Kinasen | RAB27A | RAB27A, RAS oncogene family | [55, 116, 117] |
| | RAB27B | RAB27B, RAS oncogene family | [117, 118] |
| | TBC1D10A (EPI64) | TBC1 domain family member 10A | [119] |
| | RAB5A | RAB5A, RAS oncogene family | [110] |
| | RAB35 | RAB35, RAS oncogene family | [120] |
| | RAB11* | RAB11, RAS oncogene family | [120] |
| Weitere | STEAP3 (TSAP6) | STEAP3 metalloproteinase | [120, 121] |
| | CHMP4C | Charged multivesicular body protein 4C | [120] |
| | EPCAM | Epithelial cell adhesion molecule | [120] |
| | FLOT1* | Flotillin 1 | [122] |
| | FLOT2* | Flotillin 2 | [122] |
| Matrix-Metallo- Proteinasen | MMP2 | Matrix Metalloproteinase 2 | [123] |
| | MMP9 | Matrix Metalloproteinase 9 | [123] |
| | MMP14 | Matrix Metalloproteinase 14 | [123] |

Tabelle 3.1: Initiales Panel von Genen mit Bedeutung für die exosomale Sekretion.

Die aufgeführten Gene wurden mittels Literaturrecherche ausgewählt: Bei NCBI PubMed und MEDPILOT wurden die Begriffe „exosomes AND release“, „exosomes AND secretion“ und „exosomes AND regulation“ zur Suche verwendet und anhand der Abstracts Publikationen ausgewählt und nach Genen mit Assoziation zur exosomalen Sekretion durchsucht. Die mit einem Stern* markierten Kandidaten konnten im Folgenden nicht weiter verfolgt werden, da sie im zur weiteren Selektion verwendeten Datensatz von Taylor *et al.* (DS1) nicht vorhanden waren. (PCa: Prostatakarzinom)

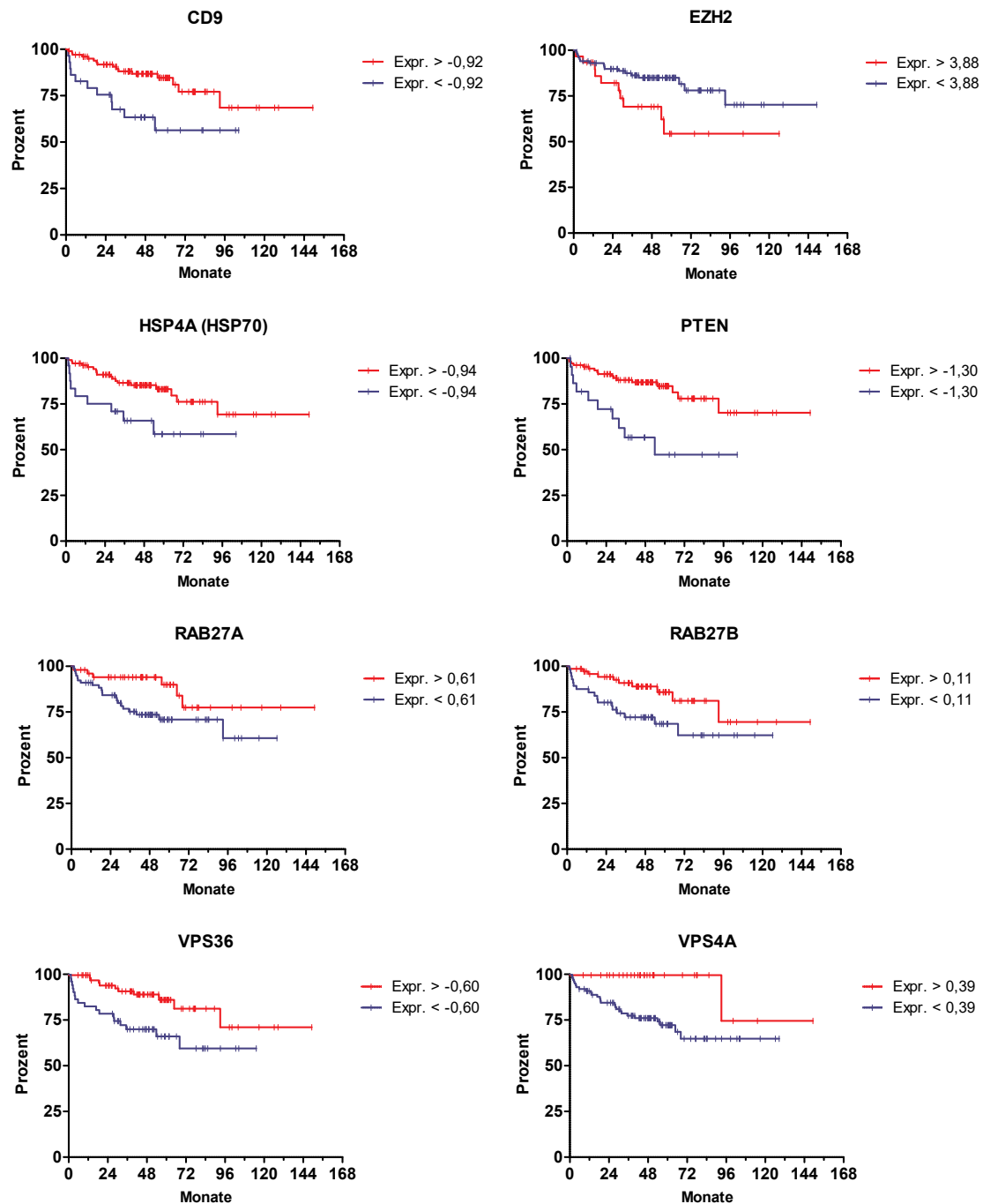


Abbildung 3.1: Zeit bis zum Biochemischen Rezidiv für ausgewählte Gene. Von den 34 eingeschlossenen erfüllten die dargestellten acht Gene (*CD9*, *EZH2*, *HSP70*, *PTEN*, *RAB27A*, *RAB27B*, *VPS36*, *VPS4A*) die gewählten Anforderungen, dass jeweils mindestens 20 Patienten über und unterhalb des Cutoff-Wertes liegen müssen und sich die Gruppen in der Überlebensanalyse beim Log-Rang Test statistisch signifikant unterscheiden. Zur weiteren Analyse wurden anschließend die mit der exosomalen Sekretion assoziierten Gene *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* ausgewählt. Die Genexpression (Expr.) ist als Z-Scores vs. normals angegeben. Die Gesamtheit der erstellten Kaplan-Meier-Graphen ist im Anhang in Abbildung 5.1 ab S. 97 zu finden.

| Gen | Cutoff [z-Score] | Über Cutoff | | Unter Cutoff | | p-Wert (Log-Rang) |
|----------------|---------------------|-------------|--------|--------------|--------|----------------------|
| | | Pat. | Events | Pat. | Events | |
| AMCAR | 3.390 | 59 | 9 | 72 | 18 | 0.213 |
| AR | -1.113 | 12 | 5 | 119 | 22 | 0.043 |
| CD63 | 1.814 | 126 | 24 | 5 | 3 | 0.014 |
| CD81 | 0.531 | 122 | 22 | 9 | 5 | 0.001 |
| CD9 | -0.923 | 29 | 11 | 102 | 16 | 0.007 |
| CHMP4C | 3.266 | 124 | 23 | 7 | 4 | 0.004 |
| DCT | -1.809 | 7 | 3 | 124 | 24 | 0.083 |
| EPCAM | 1.957 | 63 | 9 | 68 | 18 | 0.111 |
| EZH2 | 3.883 | 101 | 17 | 30 | 10 | 0.027 |
| FOLH1 | 1.957 | 120 | 18 | 11 | 9 | < 0.001 |
| HSPA4 (HSP70) | -0.941 | 25 | 9 | 106 | 18 | 0.017 |
| HSP90AA1 | -0.964 | 15 | 8 | 116 | 19 | 0.002 |
| IST1 | -2.275 | 10 | 7 | 121 | 20 | < 0.001 |
| KLK3 (PSA) | 0.683 | 99 | 23 | 32 | 4 | 0.225 |
| MMP14 | 1.741 | 126 | 24 | 5 | 3 | < 0.001 |
| MMP2 | -0.879 | 69 | 11 | 62 | 16 | 0.293 |
| MMP9 | 0.669 | 6 | 0 | 125 | 27 | 0.233 |
| PCA3 | 2.452 | 46 | 6 | 85 | 21 | 0.123 |
| PDCD6IP (Alix) | -1.909 | 5 | 3 | 126 | 24 | 0.003 |
| PTEN | -1.300 | 23 | 10 | 108 | 17 | 0.001 |
| RAB27A | 0.606 | 79 | 21 | 52 | 6 | 0.033 |
| RAB27B | 0.106 | 57 | 17 | 74 | 10 | 0.022 |
| RAB35 | 1.168 | 106 | 25 | 25 | 2 | 0.079 |
| RAB5A | -1.507 | 10 | 5 | 121 | 22 | 0.001 |
| SNF8 | 1.397 | 121 | 27 | 10 | 0 | 0.176 |
| STEAP3 | -2.120 | 11 | 5 | 120 | 22 | 0.007 |
| TBC1D10A | -0.699 | 75 | 19 | 56 | 8 | 0.058 |
| TSG101 | -1.672 | 7 | 4 | 124 | 23 | 0.002 |
| UBAP1 | -1.771 | 16 | 8 | 115 | 19 | 0.001 |
| VPS25 | -1.651 | 17 | 6 | 114 | 21 | 0.206 |
| VPS28 | -2.466 | 6 | 0 | 125 | 27 | 0.173 |
| VPS36 | -0.604 | 52 | 17 | 79 | 10 | 0.005 |
| VPS4A | 0.394 | 100 | 26 | 31 | 1 | 0.009 |
| VTA1 | -1.277 | 11 | 5 | 120 | 22 | 0.001 |

Tabelle 3.2: Überlebensanalysen für Zeit bis BCR: Genexpressions-Cutoff-Werte, Gruppengrößen und log-rank-Test. Die Cutoff-Werte wurden mittels Partitionstests bestimmt. Die Anzahl der Patienten jeweils über- und unterhalb des Cutoffs sind gemeinsam mit der Anzahl von BCR-Events in den jeweiligen Gruppen angegeben. Von den Genen, die mindestens 20 Patienten pro Gruppe aufwiesen und für die sich die Gruppen im Log-Rang-Test signifikant unterschieden wurden nur *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* für die weitere Untersuchung ausgewählt. Die Cutoffwerte sind als z-Scores vs normals angegeben.

3.2 Expression der Kandidaten im lokalisierten PCa und in Metastasen

Eine mögliche Über- oder Unterexpression von *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* in lokalisierten PCa oder Metastasen gegenüber benignen Kontrollen wurde in *in silico* in den Microarray-Datensätzen von Taylor *et al.* (DS1), Yu *et al.* (DS2) und Tomlins *et al.* (DS3) sowie mittels RT-qPCR im Tissue Scan Array und der TUR-Kohorte untersucht. *In silico* wurden jeweils benigne Proben, lokalisierte PCa und metastatische Proben mittels Kruskal-Wallis-Tests verglichen. Für die mittels PCR gewonnenen Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Tests benigne Kontrollen mit den lokalisierten PCa gegenübergestellt. Die Ergebnisse der drei Microarray-Datensätze sind in Abb. 3.2 dargestellt. Details zu den Ergebnissen der statistischen Auswertungen sind im Anhang ab S. 91 in den Tab. 5.1 bis 5.4 angegeben.

RAB27A zeigte in den Datensätzen von Yu *et al.* (DS2) und Tomlins *et al.* (DS3) eine statistisch signifikante Unterexpression der metastatischen gegenüber den benignen Proben (Abb. 3.2 d, g). Beim Datensatz von Taylor *et al.* (DS1) zeigten die Gruppe der lokalisierten PCa eine statistisch signifikant *höhere* Expression als die Gruppe der benignen Proben, die metastatischen Proben zeigten eine signifikant *geringere* Expression als die lokalisierten PCa (Abb. 3.2 a). In Tissue Scan Array sowie der TUR-Kohorte lagen zwischen benignen Proben und lokalisierten PCa keine signifikanten Unterschiede vor.

Für **RAB27B** zeigten alle drei untersuchten *in silico*-Datensätze eine geringere Expression der metastatischen Proben gegenüber den benignen sowie gegenüber den lokalisierten PCa (Abb. 3.2 b, e, h). Im Datensatz von Tomlins *et al.* (DS3) waren die lokalisierten PCa zudem statistisch signifikant geringer exprimiert als die benignen Proben. Der Tissue Scan Array zeigte zwischen benignen Proben und lokalisierten PCa auch hier keinen statistisch signifikanten Unterschied; in der TUR-Kohorte unterschieden sich benigne Proben und PCa mit $p=0,052$ knapp nicht signifikant.

VPS36 war bei allen drei untersuchten *in silico*-Datensätzen in den metastatischen Proben sowohl gegenüber den lokalisierten PCa, als auch gegenüber den benignen Proben statistisch signifikant geringer exprimiert (Abb. 3.2 c, f, h). Im Tissue Scan Array zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen benignen Proben und lokalisierten PCa, die TUR-Kohorte bot eine signifikante Unterexpression der lokalisierten PCa gegenüber den benignen Kontrollen ($p=0,023$).

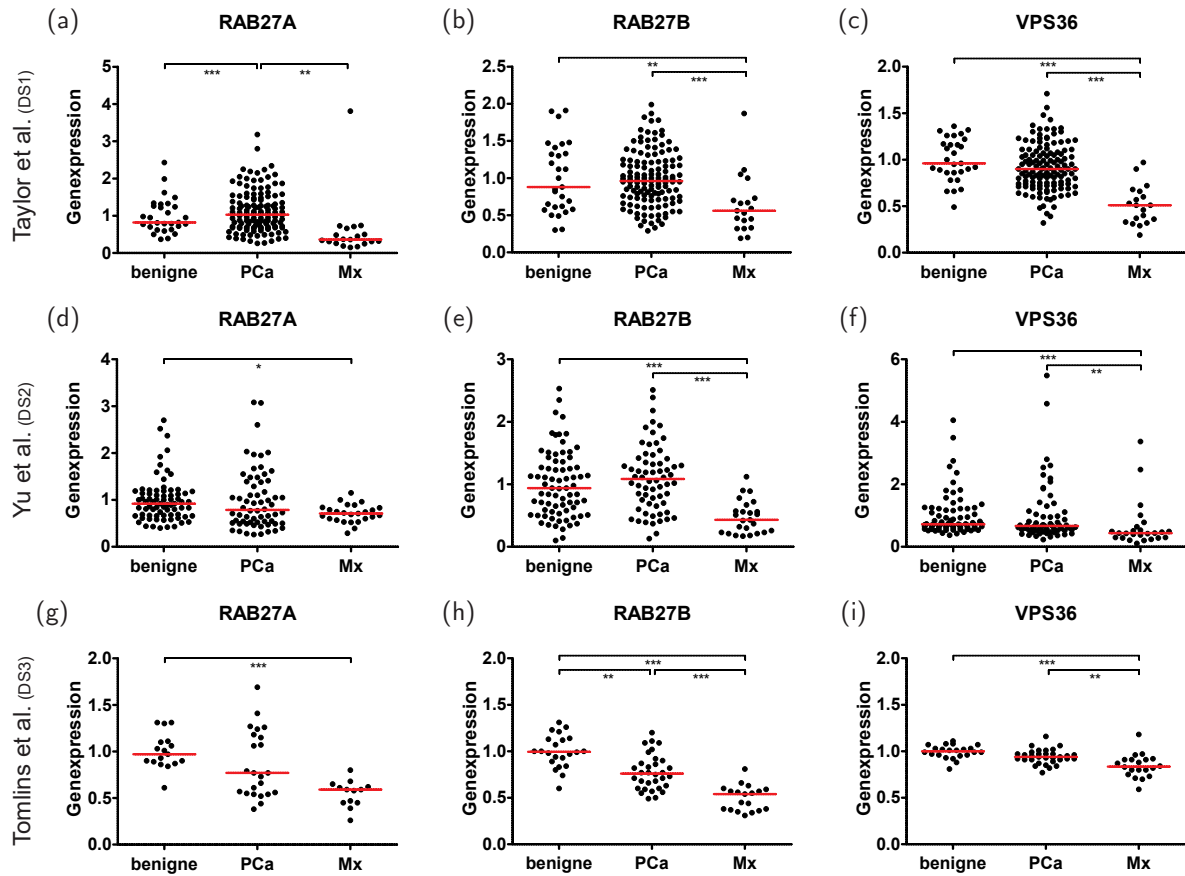


Abbildung 3.2: Expression von RAB27A, RAB27B und VPS36 bei benignen Proben, Gewebe aus Prostatakarzinomen und Metastasen. Die Abbildungen a-c zeigen jeweils die Genexpressionen aus dem Datensatz von Taylor *et al.* (DS1), d-f aus Yu *et al.* (DS2) und g-i aus Tomlins *et al.* (DS3). (Genexpression: Relative Genexpression normalisiert auf die interne Kontrolle relativ zum Kalibrator ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). PCa: Prostatakarzinom, Mx: PCa-Metastasen)

3.3 Assoziation der Kandidaten mit dem lokalen Tumorstadium

Zur Untersuchung einer möglichen Assoziation mit dem lokalen Tumorstadium liegen *in silico* Ergebnisse aus den Datensätzen von Taylor *et al.* (DS1), Yu *et al.* (DS2) sowie aus dem verwendeten *OriGene Tissue Scan Array* vor. Weder *in silico* noch in der cDNA-Kohorte zeigte sich eine Abhängigkeit der Genexpression vom lokalen Tumorstadium. Bei den Daten von Yu *et al.* (DS2) fiel zwar der Kruskal Wallis Test bei *RAB27B* mit $p=0,044$ knapp signifikant aus, die anschließenden posthoc-Tests nach Dunn zeigten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen benigne, T2, T3 und T4. Details zu den Ergebnissen der statistischen Tests sind im Anhang in den Tabellen 5.1 bis 5.4 ab S. 91 angegeben.

3.4 Assoziation der Kandidaten mit dem Grading nach Gleason

Eine mögliche Assoziation von *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* mit dem Grading nach Gleason wurde in *in silico* in den Datensätzen von Taylor *et al.* (DS1), Yu *et al.* (DS2) und Tomlins *et al.* (DS3) sowie in Tissue Scan Array und der TUR-Kohorte untersucht. Die Ergebnisse aus den Datensätzen von Taylor *et al.* (DS1) sowie Tomlins *et al.* (DS3) sind in Abb. 3.3 dargestellt. Details zu den Ergebnissen der statistischen Auswertungen sind im Anhang ab S. 91 in den Tabellen 5.1 bis 5.4 zu finden.

Für ***RAB27A*** zeigte sich *in silico* lediglich bei den Daten von Tomlins *et al.* (DS3) eine Unterexpression bei einem Grading von $\geq 7b$ gegenüber den benignen Kontrollen (Abb. 3.3 a,d). Bei ***RAB27B*** bot nur der Datensatz von Tomlins *et al.* (DS3) eine Unterexpression in den Proben mit einem Grading $< 7b$ sowie $\geq 7b$ gegenüber den benignen Proben (Abb. 3.3 b,e). ***VPS36*** erschien in den Datensätzen von Tomlins *et al.* (DS3) und Taylor *et al.* (DS1) jeweils bei einem Gleason Grading $\geq 7b$ gegenüber den benignen Proben unterexprimiert (Abb. 3.3 c,f).

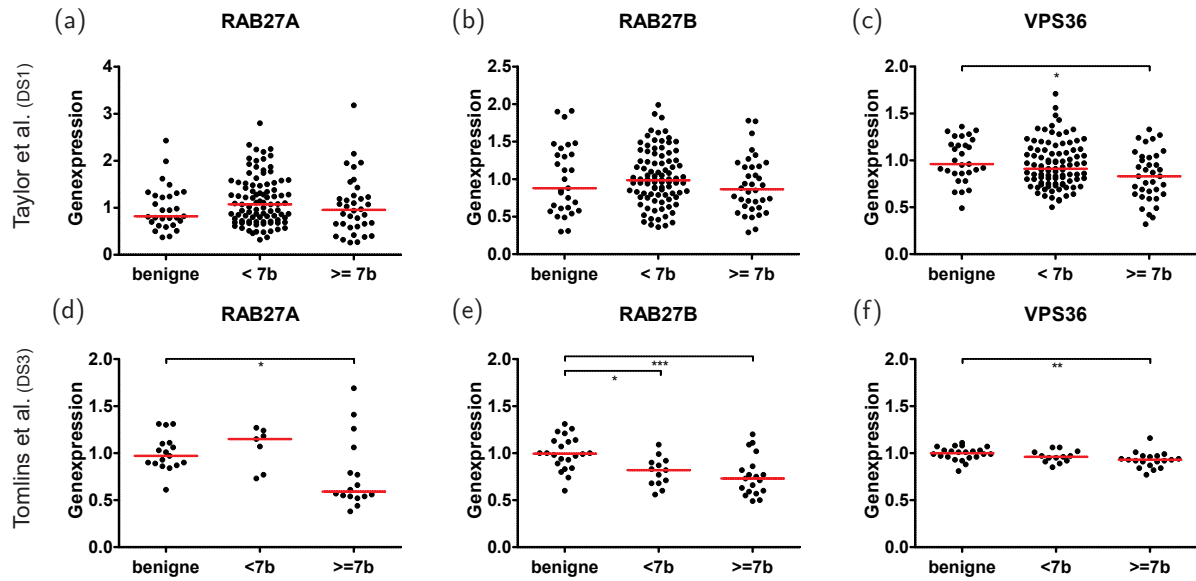


Abbildung 3.3: Expression von RAB27A, RAB27B, VPS36 abhängig vom Grading nach Gleason. Die Abbildungen a-c zeigen die Genexpressionen aus den Daten von Taylor *et al.* (DS1), Abbildungen d-f aus dem Datensatz von Tomlins *et al.* (DS3). Bei den Daten von Yu *et al.* (DS2), im Tissue Scan Array und in der TUR-Kohorte unterschieden sich die untersuchten Gruppen (benigne, ≤ 7 , > 7) nicht statistisch signifikant. (*Genexpression*: Relative Genexpression normalisiert auf die interne Kontrolle relativ zum Kalibrator ($2^{-\Delta\Delta C_T}$).)

Im Datensatz von Yu *et al.* (DS2) und dem Tissue Scan Array konnte in den Gruppenvergleichen kein Zusammenhang mit dem Grading nach Gleason festgestellt werden. In der TUR-Kohorte fiel der Kruskal Wallis Test mit $p=0,045$ zwar knapp statistisch signifikant aus, die angeschlossenen posthoc-Tests nach Dunn konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen benigner Proben, Gleason ≤ 7 und Gleason > 7 nachweisen.

3.5 Assoziation der Kandidaten mit Androgendeprivationstherapie

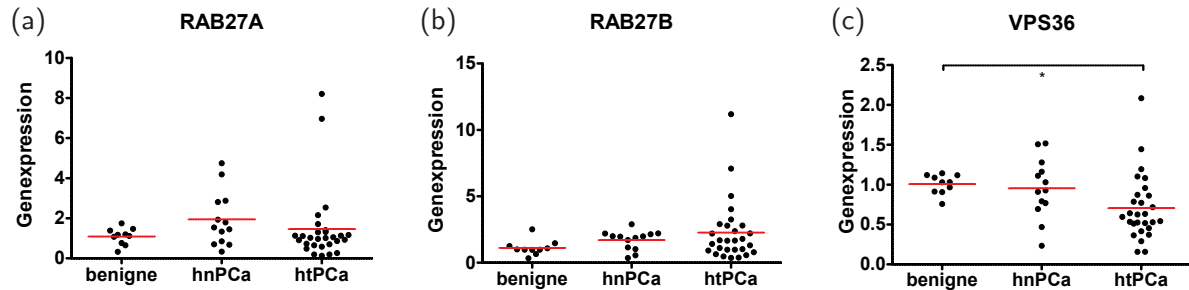


Abbildung 3.4: Expression von RAB27A, RAB27B und VPS36 vor und nach Androgendeprivationstherapie. Die Abbildungen a-c zeigen die Expressionsdaten der jeweiligen Gene aus der vor Ort akquirierten TUR-Kohorte. Der Vergleich hnPCa vs htPCa fiel bei *VPS36* mit $p=0,059$ knapp nicht signifikant aus. (*Genexpression*: Relative Genexpression normalisiert auf die interne Kontrolle relativ zum Kalibrator ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). *hnPCa*: hormonnativ PCa; *htPCa*: PCa mit Zustand nach Androgendeprivationstherapie).

Für die Betrachtung des weiter fortgeschrittenen Krankheitsstadiums der HR konnte nur die TUR-Kohorte herangezogen werden, da die anderen Kohorten nicht genügend Patienten mit Zustand nach ADT boten. Die Expression von *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* wurde mittels qPCR bestimmt und Patienten mit BPH, hormonnativem (hnPCa) und hormonrefraktärem Karzinom (htPCa) mittels Kruskal-Wallis-Tests und anschließenden Dunn-Posthoc-Tests verglichen. Für *RAB27A* und *RAB27B* konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen festgestellt werden (Abb. 3.4 a,b). Für *VPS36* zeigte die Gruppe der htPCa eine signifikant niedrigere Expression als die benignen Kontrollen und gegenüber den hnPCa eine Tendenz zur Unterexpression ($p=0,059$; Abb. 3.4 c).

3.6 Expression von AR in PCa, Assoziation mit Differenzierung und Androgendeprivationstherapie

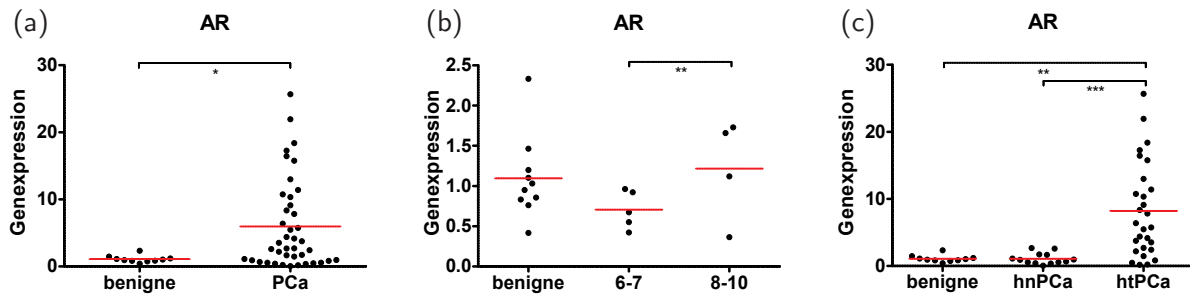


Abbildung 3.5: Expression von AR in der TUR-Kohorte. In der TUR-Kohorte wurde die Expression von AR von PCa gegenüber benignen Kontrollen (a), in Abhängigkeit vom Grading nach Gleason (b) sowie bei Proben mit und ohne Androgendeprivationstherapie (c) analysiert. (*Genexpression: Relative Genexpression normalisiert auf die interne Kontrolle relativ zum Kalibrator ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)*). *hnPCa: Hormontherapie-native PCa; htPCa: PCa mit Zustand nach Androgendeprivationstherapie*).

Abseits der mit der Sekretion von Exosomen assoziierten Gene wurde für die Erstellung von Korrelationsanalysen in der TUR-Kohorte zusätzlich die Expression von AR durch qPCR bestimmt. Hier wurden mittels Kruskal-Wallis-Tests Vergleiche zwischen den benignen und malignen Proben, für Grading nach Gleason (benigne vs. Gleason 6-7 vs. Gleason 8-10) und für den Hormontherapie-Status (benigne vs. PCa ohne ADT (hnPCa) vs. PCa mit Z.n. ADT (htPCa)) angestellt.

Für die Proben aus lokalisierten PCa zeigte sich eine signifikante Überexpression gegenüber den benignen Kontrollen (Abb. 3.5 a) und innerhalb der hnPCa eine signifikante Überexpression bei einem Gleason von 8 bis 10 gegenüber den besser differenzierten PCa (Abb. 3.5 b). Die Proben aus htPCa zeigten eine signifikante Überexpression sowohl gegenüber den benignen Kontrollen, als auch im Vergleich zu den hnPCa (Abb. 3.5 c). Zusätzliche Details zur statistischen Auswertung sind im Anhang in Tab. 5.5 auf S. 95 zu finden.

3.7 Einfluss der Kandidaten auf das Gesamtüberleben

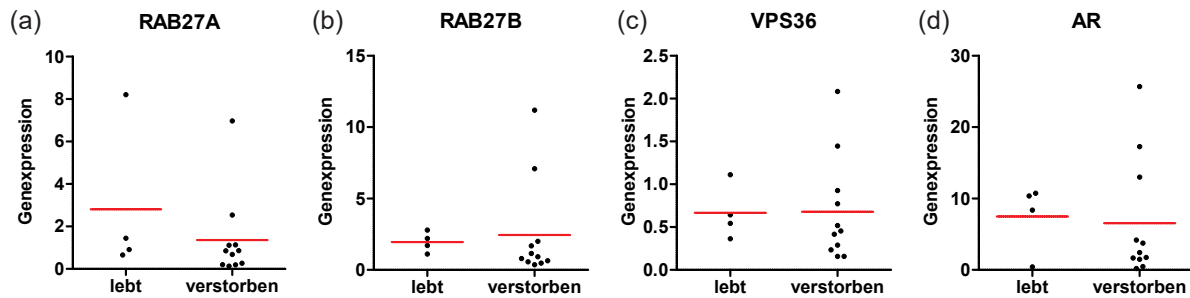


Abbildung 3.6: Assoziation der Expression von RAB27A, RAB27B, VPS36 und AR mit dem Gesamtüberleben. Die Abbildungen a-d zeigen die Genexpression abhängig davon, ob der Patient zum Zeitpunkt der Überlebensabfrage noch lebte oder verstorben war. Von den 39 Patienten der Kohorte mit PCa konnten leider nur bei 15 Patienten, von denen elf verstorben waren, Daten gewonnen werden. (*Relative Genexpression: Normalisiert auf die interne Kontrolle relativ zum Kalibrator angegeben ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)*).

Bei der wie in Abschnitt 2.12 beschrieben durchgeführten Überlebensabfrage konnten leider nur Informationen von insgesamt 15 Patienten gewonnen werden. Elf davon waren zum Zeitpunkt der Abfrage verstorben, bei nur sechs konnte ein Todeszeitpunkt ermittelt werden. Damit waren Analysen des Überlebens wie Kaplan-Meier-Vergleiche nicht sinnvoll durchführbar und es wurde lediglich zur Übersicht ein Gruppenvergleich zwischen den zum Zeitpunkt der Abfrage lebenden und den verstorbenen Patienten mittels *Mann-Whitney-U-Tests* durchgeführt. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Genexpression zwischen den Gruppierungen.

3.8 Korrelationsanalysen der Genexpressionen untereinander

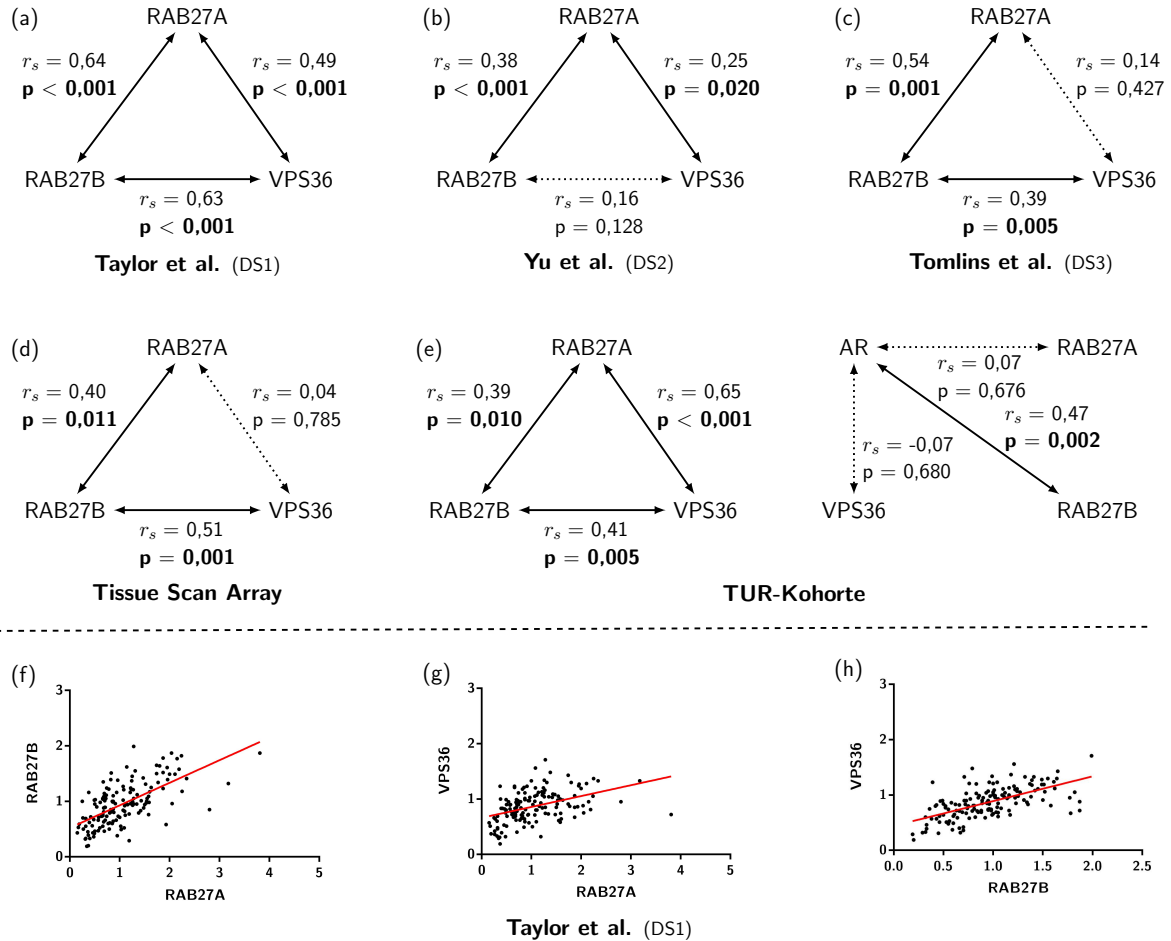


Abbildung 3.7: Korrelationen von RAB27A, RAB27B, VPS36 und AR untereinander. Für die untersuchten *in silico*-Datensätze und die mittels RT-qPCR gewonnenen Daten wurden jeweils für *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* (und bei der TUR-Kohorte zusätzlich mit *AR*) untereinander Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt. Die Ergebnisse mit entsprechenden r_s - und p -Werten sind in den Diagrammen a-e angegeben. Die durchgezogenen Linien und fettgedruckten p -Werte markieren statistisch signifikante Ergebnisse. Abbildungen f-h zeigen exemplarisch die Korrelationen für den Datensatz von Taylor *et al.* (DS1) graphisch.

In den Datensätzen von Taylor *et al.* (DS1), Yu *et al.* (DS2), Tomlins *et al.* (DS3), dem Tissue Scan Array und der TUR-Kohorte wurden mögliche Korrelationen der Expression der Gene *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* untereinander mittels Korrelationsanalysen nach Spearman untersucht. Bei der TUR-Kohorte wurde zusätzlich die Expression von

AR in die Auswertung mit einbezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 und im Anhang auf S. 96 in Tabelle 5.6 zusammengefasst. Die visuelle Inspektion der relevanten Paarungen zeigte jeweils monotone Zusammenhänge. Exemplarisch ist dies für den Datensatz von Taylor *et al.* (DS1) in Abbildung 3.7 f-h dargestellt.

Zwischen ***RAB27A*** und ***RAB27B*** zeigte sich in allen untersuchten Datensätzen statistisch signifikante, mittelstarke Korrelationen mit r_s zwischen 0,38 und 0,54. Für ***RAB27A*** und ***VPS36*** ergaben die Untersuchungen der Datensätze von Yu *et al.* (DS2), Taylor *et al.* (DS1) und der TUR-Kohorte statistisch signifikante Korrelationen mit r_s zwischen 0,14 und 0,65. ***RAB27B*** und ***VPS36*** korrelierten mit Ausnahme des von Yu *et al.* (DS2) in allen untersuchten Datensätzen mit r_s zwischen 0,39 und 0,63 statistisch signifikant miteinander. Für ***AR*** zeigte sich in der TUR-Kohorte lediglich mit *RAB27B* eine statistisch signifikante Korrelation ($r_s=0,47$).

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie soll überprüft werden, ob Veränderungen in den Mechanismen der exosomalen Sekretion beim PCa einen Einfluss auf klinisch-pathologische Parameter oder das Überleben haben. Dazu wurde ein Panel von Genen mit bekannter Funktion bei Sekretion und Biogenese von Exosomen zusammengestellt. Assoziation dieser Gene mit dem Auftreten eines Biochemischen Rezidivs (BCR) als Indikator für Erkrankungsprogression wurden in einem großen, bereits bestehenden Microarray-Datensatz *in silico* untersucht und als Ergebnis konnten *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* für die weitere Untersuchung identifiziert werden. Hier wurden im Anschluss Assoziationen der jeweiligen Expression mit klinischen und pathologischen Parametern sowie Korrelationen der Expression untereinander in weiteren, bereits bestehenden Microarray-Datensätzen und in zwei unabhängigen Patientenkohorten mittels qRT-PCR aufgearbeitet.

4.1 Zusammenstellung des Kandidatenpanels, Selektionsprozess und zur weiteren Analyse ausgewählte Gene

Der Auswahlprozess

Die Auswahl von Genen für die weitere Untersuchung aus dem initialen Panel erfolgte anhand eines bereits bestehenden Datensatzes von Taylor *et al.* (DS1): Mittels Partitionstests wurden Grenzwerte für die Genexpression festgelegt und die Gruppen ober- und unterhalb des Grenzwertes bezüglich der Zeit bis zur BCR miteinander verglichen. Aus

dem initialen Panel von 41 Genen unterschieden sich die jeweiligen Gruppen oberhalb und unterhalb des Genexpressions-Grenzwertes in 22 Fällen signifikant. Die Anforderung einer jeweiligen Gruppengröße von mindestens 20 Patienten reduzierte die Zahl der Gene auf acht, aus denen schließlich *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der exosomalen Sekretion für die weitere Analyse ausgewählt wurden.

Das Gesamt- oder das PCa-spezifische Überleben als Auswahlkriterium zu verwenden, wäre der Zeit bis zum BCR vorzuziehen gewesen, jedoch ist beim PCa die Verfügbarkeit solcher Daten schlecht, da die erkrankungsspezifische Mortalität relativ gering und die für diese Endpunkte erforderlichen Nacherhebungszeiträumen entsprechend lang sind. Mit diesem Kompromiss wird eine Einschränkung der Validität erkaufte, da die Aussagekraft des Surrogatparameters für das Gesamtüberleben eingeschränkt ist und eine einheitliche Definition des BCR fehlt.^{124–127} Weiterhin ist anzumerken, dass die angewandten Auswahlkriterien nicht standardisiert, sondern nach eigenem Ermessen gewählt wurden.

Die ausgewählten Gene

RAB27A* und *RAB27B kodieren für zwei Mitglieder der Familie der Rab-GTPasen, die an verschiedenen intrazellulären Transportmechanismen (Vesikelbildung, Transport entlang des Zytoskelettes, Fusion an Zielstrukturen) beteiligt sind. Sie können zwischen einer aktiven, GTP-bindenden und einer inaktiven, GDP-bindenden Konfiguration umgeschaltet werden, wobei das Umschalten zwischen aktiver und inaktiver Form durch *Guanine nucleotide exchange factors* (GEF) und *GTPase-activating proteins* (GAP) vermittelt wird.¹²⁸

Durch Interaktion mit spezifischen Proteinkomplexen stellen die beiden RAB27-Isoformen wichtige Mediatoren der exosomalen Sekretionsmaschinerie dar,^{129–131} wobei in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Rab-GTPasen wie Rab11 und Rab35 an der exosomalen Sekretion beteiligt zu sein scheinen.^{132,133} RAB27B vermittelt vor allem den Transport von MVBs zur Zellmembran und RAB27A die dortige Fusion und damit die Freisetzung des MVB-Inhaltes.⁵³

Die Rolle der beiden GTPasen wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem beim Mammakarzinom, kolorektalen Karzinom und malignen Melanom untersucht. Eine erhöhte Expression ist meist mit Krankheitsprogression und einer schlechteren Prognose assoziiert,^{55,119,134–137} wobei es auch Hinweise für protektive Effekte erhöhter Genexpression gibt.¹³⁸ Im Kontext des PCa liefern zwei Studien Hinweise, dass RAB27A im Prostata-Gewebe an der Sekretion von PSA und PSMA durch Modulation des PI3K-Signalweges beteiligt ist.^{139,140} Verlust der Funktion von RAB27A führt beim Menschen zum seltenen Griscelli Syndrom, das durch Immundefizienz und kutanem Albinismus gekennzeichnet ist.^{141,142}

VPS36 kodiert für ein gleichnamiges Mitglied des ESCRT-II-Komplexes, welches gemeinsam mit weiteren Komponenten des Komplexes an der Genese von MVBs beteiligt ist: ESCRT-0 initiiert den Signalweg, ESCRT-I und ESCRT-II stabilisieren die Membranknospung eines wachsenden MVB und ESCRT III beendet die Vesikelabschnürung gemeinsam mit VPS4.¹⁴³ Hier liegt auch die mögliche Verbindung zur exosomalen Sekretion,¹⁴⁴ da Exosomen durch Fusion von MVBs mit der Zellmembran sezerniert werden,⁵⁶ wobei Studien, die *direkt* eine Verbindung von VPS36 zur exosomalen Sekretion im PCa belegen, bisher fehlen. Im Rahmen der Zellteilung ist VPS36 an der Membranabtrennung bei der Zytokinese eingebunden^{145,146} und vermittelt die Partikel-Abschnürung von HI-Viren.⁹⁵ Weitere Funktionen der ESCRT-Bestandteile sind die Abschnürung anderer Mikrovesikel-Populationen, die Reparatur von Zell- und Kernmembran und das Kappen von Neuronen.¹⁴⁷ Außerdem beeinflusst *VPS36* (gemeinsam mit AR) die Entwicklung des Kammes von Hühnern.¹⁴⁸ Über die Rolle des Genes in der Tumorbilogie ist bisher nur wenig bekannt. Deregulierung des JAK/STAT-Signalweges in Gewebe mit mutiertem ESCRT-II resultiert in erleichterter Tumorgenese in *Drosophila*.

In den folgenden Abschnitten wird der Einfluss der genannten Kandidatengene auf lokale Progression und Metastasierung des PCa diskutiert.

4.2 Assoziation der Kandidaten mit klinischen und pathologischen Parametern

Um zu überprüfen, ob die Expression von *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* einen Einfluss auf klinisch-pathologische Parameter oder die Metastasierung hat, wurden Genexpressions-Datensätze von Taylor *et al.* (DS1), Yu *et al.* (DS2) und Tomlins *et al.* (DS3) sowie mittels qPCR gewonnene Daten aus dem kommerziell verfügbaren Tissue Scan Array[®] und der vor Ort akquirierten TUR-Kohorte analysiert. Ein möglicher Einfluss auf das Gesamtüberleben sollte mittels Überlebensstatistiken in der TUR-Kohorte überprüft werden.

***RAB27A* und *RAB27B* in metastatischem Gewebe unterexprimiert, Rolle für lokale Tumorentwicklung und Gesamtüberleben ungeklärt**

In den Datensätzen von Taylor *et al.* (DS1), Yu *et al.* (DS2) und Tomlins *et al.* zeigte sich bei Gewebe aus Metastasen konsistent eine *Unterexpression* von *RAB27A* und *RAB27B*. In *Tissue Scan Array* und *TUR-Kohorte* konnte dies nicht überprüft werden, da dort Material aus Metastasen fehlte.

In einzelnen Datensätzen konnte bei *RAB27A* und *RAB27B* jeweils eine Über- respektive Unterexpression in lokalisierten PCa festgestellt werden, was in den PCR-Messungen nicht bestätigt werden konnte. Für das lokale Tumorstadium konnte keine Assoziation mit der Expression von *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* beobachtet werden und für das Grading nach Gleason zeigten sich nur *in silico* in einzelnen Datensätzen eine *Unterexpression* bei einem Grading von $\geq 7b$, was in den cDNA-Kohorten jedoch nicht bestätigt werden konnte. Eine Überprüfung eines Einflusses auf das Gesamtüberleben war leider aufgrund der spärlichen Datenlage nicht sinnvoll möglich.

Zur Bedeutung von *RAB27A* und *RAB27B* für klinische Parameter und Krankheitsprogression des PCa existieren bisher keine Studien. Aus anderen Tumorentitäten gibt es hingegen einige Untersuchungen, die unter den Tumorentitäten und teils auch innerhalb dieser gegensätzliche Ergebnisse zeigen (siehe Tabelle 4.1).

| Entität | Korrelation mit... | | | | | | Ref. |
|---------------------|------------------------|----------------|----------------|--------|-----------------|--------|--------------|
| | Invasivit. / Differen. | | Metastasierung | | Gesamtüberleben | | |
| | RAB27A | RAB27B | RAB27A | RAB27B | RAB27A | RAB27B | |
| Gliome | + | | | | – | – | 149, 150 |
| Hepatozelluläres Ca | + | + | | | – | – | 134 |
| Kolorektales Ca | +/- | +/- | – | +/- | – | +/- | 134–136, 138 |
| Magen-Ca | | | | | – | – | 134 |
| Mamma-Ca | + | +/ \emptyset | + | | | – | 151–154 |
| Melanom | + | | | | | | 155 |
| Osteosarkom | | | | + | | | 156 |
| Ovarial-Ca | | + | | + | | – | 157 |
| Pankreas-Ca | | + | | + | | – | 158 |
| Urothel-Ca | + | + | | | | | 159 |

Tabelle 4.1: Einfluss von *RAB27A* und *RAB27B* bei verschiedenen Tumorentitäten. Der Einfluss von *RAB27A* und *RAB27B* auf klinisch-pathologische Parameter (Invasivität, Differenzierungsgrad), Metastasierung und das Gesamtüberleben scheint bei verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich gerichtet zu sein. Insbesondere beim Kolorektalen Karzinom gibt es divergente Studienergebnisse. (Ref.: Referenzen; Ca: Karzinom; +: Positive Assoziation; \ominus : Negative Assoziation; \emptyset : Keine Assoziation).

Insbesondere beim Mammakarzinom sind bereits einige Studien zum Einfluss von *RAB27A* und *RAB27B* vorhanden. Wang *et al.* sahen *in vitro* für *RAB27A* eine positive Korrelation der Expression mit Invasivität und metastatischem Potential.¹⁵² Hendrix *et al.* zeigten *in vitro*, dass eine erhöhte Expression von *RAB27B* die Zellteilung beschleunigt und durch Sekretion von *HSP90 α* abhängig von *MMP2* die Invasivität steigert. Bei klinischen Proben fanden sie eine Assoziation erhöhter *RAB27B*-Expression mit Lymphknotenmetastasierung, ungünstiger Differenzierung und nachteiliger Prognose.^{151, 154}

In einer Studie zum Blasenkarzinom vermittelte eine erhöhte Expression von *RAB27B* durch Ausschleusung von Tumor-Suppressor-miRNAs die Progression zur Muskelinvasivität¹⁵⁹ und im Ovarialkarzinom zeigt eine Studie eine Assoziation erhöhter Expression von *RAB27B* mit mehr Metastasierung und einem schlechteren Outcome.¹⁵⁷ Beim malignen Melanom gibt es Hinweise, dass Überexpression von *RAB27A* einen stimulierenden Einfluss auf die Proliferation hat¹⁵⁵ und beim Pankreaskarzinom korrelierte die Expression mit klinisch-pathologischen Eigenschaften und einem schlechteren Gesamtüberleben.¹⁶⁰ Dong *et al.* fanden beim hepatozellulären Karzinom eine Überexpression von *RAB27A*, jedoch eine Unterexpression von *RAB27B*, wobei eine erhöhte Expression beider Gene mit einem kürzeren Überleben einherging.¹³⁴

Lediglich beim Kolorektalen Karzinom (KRK) liegen Studien vor, die einen Zusammenhang zwischen Erkrankungsprogress und *erniedrigter* Expression von *RAB27A* und *RAB27B* zeigen: Shi *et al.* fanden im KRK gegenüber benigne Kontrollen zwar eine Überexpression von *RAB27A* und eine positive Korrelation mit T- und N-Stadium, innerhalb der Tumore zeigte sich jedoch ein *schlechteres* Gesamtüberleben bei *Untereexpression* von *RAB27A*.¹³⁵ Zusätzlich stellten Dong *et al.* bei *niedrigerer* Expression von *RAB27A* und *RAB27B* im KRK eine Assoziation mit schlechterer Differenzierung, höherem Lokaltadium, vermehrter vaskulärer Invasion, Lokalrezidiven, Fernmetastasierung und ein schlechteres Gesamtüberleben fest.^{134,138} Bao *et al.* fanden im Gegensatz dazu bei Patienten mit KRK eine *positive* Assoziation der Expression von *RAB27B* mit klinischen und pathologischen Parametern sowie ein *kürzeres* Überleben bei *erhöhter* Expression.¹³⁶

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Tumorentitäten legen nahe, dass die beiden RAB-GTPasen sowohl abhängig vom Ursprungsgewebe als auch von der Situation unterschiedliche oder gar gegensätzliche Funktionen in der Tumorbilogie ausüben könnten. Ein solch verschiedentlich gerichteter Einfluss auf die Progression von Krebserkrankungen wurde auch bei der GTPase Rab25 beobachtet, die bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches herabreguliert ist,^{161,162} beim Urothelkarzinom hingegen überexprimiert zu sein scheint.¹⁶³

Solche verschiedenen Funktionen der selben Gruppe von Genen könnte durch Expression unterschiedlicher Isoformen, differentielle Regulation der Aktivität oder Interaktion mit unterschiedlichen Effektormolekülen bedingt sein. So wird in verschiedenen Organen eher die eine oder die andere RAB27-Isoform exprimiert: Zellen des Urothelkarzinoms produzieren eher RAB27B als RAB27A¹⁶⁴ und in Brustkrebszellen von Mäusen ist eher RAB27A als RAB27B für die exosomale Sekretion verantwortlich.¹⁶⁴

Weiterhin könnte eine differenzierte Rolle durch unterschiedliche Regulation der Gene durch ihre GEFs und GAPs, die als molekulare Schalter die Rekrutierung der GTPasen steuern,¹⁶⁵ oder durch Interaktion mit jeweilig anderen zellulären Funktionen, auch außerhalb der exosomalen Sekretion, erklärbar sein.^{128,166–168} So reduziert zum Beispiel der Knockdown von *RAB27A* neben der exosomalen Sekretion auch die Produktion von *MMP9*.¹⁶⁴

Unter den vorgefundenen Studien untersuchten nur Ostenfeld *et al.* tatsächlich Material aus Metastasen,¹⁵⁹ während bei den anderen lediglich *Assoziationen* mit dem klinischen Merkmal Metastasierung oder bestimmten Eigenschaften *in vitro* beschrieben wurden. Die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Studie ist dadurch eingeschränkt.

Die Annahme, dass *RAB27A* und *RAB27B* in metastatischen PCa herabreguliert sein könnten, basiert auf Daten aus Microarrays und für diesen Aspekt konnte aufgrund fehlendem Materials keine qPCR-Validierung durchgeführt werden. Weiterhin betrachtet die vorliegende Studie ausschließlich die Ebene der mRNA, sodass Effekte auf der proteomischen Ebene nicht miterfasst wurden. Außerdem ist anzumerken, dass im Datensatz von Yu *et al.* (DS2) einige metastatische Proben von denselben Patienten stammen.⁸⁷ Ob die GTPasen einen Einfluss auf lokale Invasion und Differenzierungsgrad besitzen, lässt sich anhand der vorliegenden Daten für das PCa entsprechend nicht sicher abschließend beurteilen.

Insgesamt scheint es dennoch plausibel, dass eine Herabregulation von *RAB27A* und *RAB27B* Metastasen Wachstumsvorteile verschaffen und entsprechend eine schlechtere Prognose bedingen könnte. Die Mechanismen hierbei könnten Variationen in der Regulation und Funktion der GTPasen selbst aber auch von Tumorentität und Situation abhängige, differenzierte Funktion der Exosomen für die Tumorbilogie sein (dazu ab S. 55 mehr). Dazu und zur Validierung eines Einflusses auf das Gesamtüberleben sind weitere Untersuchungen nötig. Hierbei ist anzumerken, dass die entsprechenden Endpunkte beim PCa meist erst nach langer Zeit erreicht werden und entsprechend lange Beobachtungszeiträume nötig wären.

VPS36 in metastatischem Gewebe unterexprimiert, Einfluss auf Gesamtüberleben ungeklärt

Für *VPS36* fand sich in allen Microarray-Datensätzen eine Unterexpression in metastatischem Gewebe, was in Tissue Scan Array und TUR-Kohorte in Ermangelung von Material aus Metastasen nicht überprüft werden konnte. Beim Grading nach Gleason zeigte sich *in silico* eine dezente Unterexpression bei niedrig differenzierten PCa, was in

den cDNA-Kohorten nicht nachvollzogen werden konnte. Eine Assoziation mit dem lokalen Tumorstadium konnte nicht festgestellt werden. Ob die Expression einen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat, konnte wie bei den beiden GTPasen *RAB27A* und *RAB27B* auch für *VPS36* in der TUR-Kohorte aufgrund spärlicher Datenlage nicht überprüft werden.

Zur Rolle von *VPS36* in der Tumorbilogie gibt es bisher nur wenige Daten. In Spindelzell-Lipomen, benignen Fettgewebs-Tumoren der Haut, ist *VPS36* herabreguliert¹⁶⁹ und eine Studie von Woodfield *et al.* zeigt, dass Veränderungen des ESCRT-II-Komplexes, dem *VPS36* angehört, über Deregulierung des JAK/STAT-Signalweges neoplastische Transformation in *Drosophila* erleichtert.¹⁷⁰

Die Annahmen über einen Einfluss von *VPS36* im Prozess der Metastasierung basieren ebenso wie bei *RAB27A* und *RAB27B* auf Microarray-Daten, für die mangels Materials aus Metastasen keine qPCR-Validierung durchgeführt werden konnten. Dennoch liefert die vorliegende Studie den Hinweis, dass eine *verringerte* Expression von *VP36* an der Progression des PCa zur Metastasierung beteiligt sein könnte, wobei auch hier die Mechanismen dieses Einflusses noch unklar ist. Da auch im PCa die JAK- und STAT-Signalwege eine Rolle spielen¹⁷¹ wäre eine Interaktion mit diesen bekannten onkogenen Signalwegen plausibel. Weiterhin könnte *VPS36* durch die verschiedenen Ansatzpunkte des ESCRT-Komplexes (siehe S. 50) oder, wie auch schon bei *RAB27A* und *RAB27B* postuliert, über die Rolle der Exosomen in der spezifischen Tumorbilogie des PCa das Wachstum von Metastasen beeinflussen, worauf im Folgenden weiter eingegangen wird. Die Interaktion von *VPS36* mit den genannten Signalwegen könnte in weiteren Studien, z.B. mittels Knock-Down und/oder Überexpression von *VPS36* und Bestimmung der Aktivität der Signalketten, überprüft werden.

Exosomen als heterogene Population

Von verschiedenen Tumoren sezernierte Exosomen scheinen einen beschleunigenden Einfluss auf die Erkrankungsprogression zu besitzen: So sind sie an der Tumor-Neoangiogenese¹⁷² beteiligt, begünstigen das Tumorwachstum durch Modifikation seines Microenvironments

und supprimieren über verschiedene Mechanismen das Immunsystem um im Tumorgewebe eine immunologisch privilegierte Zone zu schaffen. So können von Tumoren abstammende Exosomen Apoptose in Immunzellen induzieren,¹⁷³ regulatorische T-Zellen zur Proliferation stimulieren,¹⁷⁴ die Vermehrung von Effektor-T-Zellen hemmen¹⁷⁵ sowie die Differenzierung von dendritischen Zellen beeinträchtigen⁶¹.

Speziell im Hinblick auf den Prozess der Metastasierung gibt es Hinweise, dass Tumor-Exosomen an der Formation prämetastatischer Nischen beteiligt sind,¹⁷⁶ Knochenmarks-Progenitorzellen zu einem metastatischen Phänotyp differenzieren können⁵⁵ und dass dem PCa entstammende Exosomen Fett-Stammzellen zu einem dem PCa ähnlichen Phänotyp transformieren können.⁶⁵ Dies legt prinzipiell nahe, dass Zellen des PCa im Rahmen der Erkrankungsprogression *mehr* (und nicht weniger) Exosomen mit progressionsbeschleunigender Wirkung sezernieren würden, um zu metastasieren. Passenderweise gibt es Hinweise, dass das Blut von Patienten mit PCa vermehrt Exosomen mit für die Prostata spezifischen Markern enthält.⁷⁴

Dennoch zeigen die vorliegenden Daten eine *Unterexpression* der an der Produktion von Exosomen beteiligten Gene *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* in metastatischem Gewebe. Für beide *RAB27* Isoformen wurde eine direkte Beteiligung an der exosomalen Sekretion gezeigt und Depletion von *RAB27A* führte in einigen Studien erfolgreich zur Reduktion der exosomalen Produktion.^{53,55} Eine Unterexpression der Gene impliziert entsprechend eine Reduktion der exosomalen Sekretion.

Dieser Widerspruch macht eine differenzierte Betrachtung der Mikrovesikel nötig: Als Population von EVs konnten Exosomen bisher nicht einheitlich definiert werden (siehe Abschnitt 1.2) und es gibt immer mehr Hinweise, dass es sich tatsächlich nicht um eine homogene Gruppe handelt, sondern funktionell differenzierte Subpopulationen unterschieden werden können.⁵⁴ So zeigte eine Studie an Exosomen von B-Zellen, dass sich exosomale Marker wie CD81 und CD82 der Dichte nach differenziert anreichern lassen.¹⁷⁷ Intestinale Zellen scheinen basolateral und apikal Exosomen unterschiedlicher Eigenschaften zu produzieren¹⁷⁸ und bei Exosomen aus der Prostata gesunder Männer lassen sich mit verschiedenen Proteinen beladene Subpopulationen unterscheiden.¹⁷⁹ Depletion von *RAB27A* reduzierte in einer Studie von Bobrie *et al.* zwar die Sekretion von Exosomen,

die endosomale Marker wie CD63, Alix, TSG101 und HSC70 tragen, jedoch nicht die Ausschüttung von Exosomen, die CD9 und Mfge8 enthalten und sich von den anderen Vesikeln in Dichte und Größe unterscheiden. An PCa-Zellen zeigte sich *in vitro* eine *Steigerung* der Sekretion von bei 10 000 g nicht pelletierten Partikeln durch Knockdown von *RAB27B* und *VPS36*.¹⁸⁰

Es ist daher denkbar, dass weitere vom *endosomalen* Pathway unabhängige Sekretionswege funktionell abgrenzbare Vesikel produzieren.⁵⁴ So wäre es zum Beispiel denkbar, dass die Herabregulation von *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* die Produktion einer Subpopulation von Exosomen reduziert, die der Tumorprogression eher hinderlich sind. Mit Tumorantigenen oder HSP70 beladene Exosomen können zur Immunantwort gegen den Tumor beitragen^{181–184} und es wird auch versucht, diesen Mechanismus der Präsentation von Tumorantigenen gegenüber T-Zellen,¹⁸⁵ therapeutisch zu nutzen.⁵⁷ Eine Reduktion der Produktion dieser Faktoren für die Immunantwort gegen den Tumor wäre für die Progression förderlich.

Metastasen könnten beim PCa durch Herabregulation von *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* einen Wachstumsvorteil erhalten, indem sie darüber die Sekretion spezifischer Gruppen von Exosomen verringern, während andere, die Erkrankung befördernde Mechanismen der exosomalen Sekretion dadurch nicht beeinträchtigt werden.

Zur weiteren Aufklärung der Bedeutung exosomaler Sekretion für die Tumorbilogie des PCa sind weitere Studien nötig, die unter anderem anstreben sollten, potentielle Subgruppen von Exosomen zu differenzieren.

4.3 Korrelationen der Kandidaten untereinander

Sowohl in den *in silico* reanalysierten Datensätzen als auch in den mittels PCR analysierten Kohorten korrelierten *RAB27A* und *RAB27B* statistisch signifikant positiv miteinander. Für die Paarungen *RAB27A* und *VPS36* sowie *RAB27B* und *VPS36* zeigte sich eine solche Korrelation nur in einem Teil der Datensätze. In der TUR-Kohorte lag zudem eine statistisch signifikant positive Korrelation zwischen *AR* und *RAB27B* vor (Siehe Abb. 3.7 auf S. 46).

Studien anderer, die sich konkret mit Assoziationen der Expression von *RAB27A* und *RAB27B* untereinander beschäftigen, sind rar. Dong *et al.* stellten übereinstimmend mit der vorliegenden Studie bei einer Serie hepatozellulärer Karzinomen ebenfalls eine positive Korrelation von *RAB27A* und *RAB27B* miteinander fest.¹³⁴ Zu einem möglichen Zusammenhang in der Expression der beiden RAB27-Isoformen mit *VPS36* konnten zum gegebenen Zeitpunkt keine Untersuchungen gefunden werden.

Eine Erklärung für diese positive Korrelation von *RAB27A* und *RAB27B* könnte eine gemeinsame, upstream liegende Regulation sein. Dies scheint, auch wenn eine gänzlich einheitliche Rolle über verschiedene Organsysteme fraglich erscheint (siehe Abschnitt 4.2), plausibel, da die GTPasen trotz bekannter differentieller Funktion redundante Funktionen vermitteln.^{53, 186} So ist RAB27B unter anderem in der Lage, Effektoren von RAB27A zu binden.¹⁸⁷

Eine möglicherweise gerichteter Zusammenhang zwischen *VPS36* und den beiden RAB27-Isoformen wäre in diesem Kontext ebenfalls denkbar, da die Expression von *RAB27A* und *RAB27B* nach Knockdown von *VPS36* in PC3-Zellen signifikant anstieg, andersherum jedoch nicht.¹⁸⁰ Im Pfad der exosomalen Sekretion liegt *VPS36* als Teil von ESCRT-II mit Beteiligung an der Entstehung von MVBs^{95, 143, 188} funktionell upstream von RAB27A und B, was eine gerichtete Abhängigkeit plausibel machen würde.

Bezüglich einer Verbindung zwischen *RAB27A* und *AR* stellten Shaw *et al.* bei Patienten mit PCa eine Reduktion der Expression von *RAB27A* durch ADT fest und fanden eine AR-Bindungsstelle in der Promotor-Region von *RAB27A*. Für *RAB27B* und *VPS36* stellte die Gruppe keine Verbindungen zu *AR* fest.¹⁸⁹

In der vorliegenden Studie wurde zwar keine Korrelation der jeweiligen Expression von *RAB27A* und *AR* festgestellt, dafür jedoch eine positive Assoziation zwischen *RAB27B* und *AR*. Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit von RAB27A und RAB27B wäre es durchaus denkbar, dass *AR* auch auf *RAB27B* einen Einfluss hat.

Die Aussagekraft, die die vorliegende Studie für die diskutierte Assoziation zwischen *AR* und *RAB27B* liefert, sollte aufgrund der Heterogenität und geringen Fallzahl der TUR-Kohorte jedoch nicht überschätzt werden. Um eine von Androgenen abhängige Regulation

der beiden Rab-GTPasen weiter zu beleuchten sind weitere, gezieltere Untersuchungen an größeren Kohorten nötig, die insbesondere auch proteomische Methoden einbeziehen.

4.4 Expression der Kandidaten im Kontext der Androgendeprivationstherapie und der Expression von AR

VPS36 nach Androgendeprivationstherapie möglicherweise unterexprimiert, Interaktion mit RAB27A und RAB27B ungeklärt

Androgene spielen für die Entwicklung des PCa eine Schlüsselrolle, da sie über den Androgenrezeptor im Prostataadrüsengewebe das Verhältnis von Proliferation und Zelluntergang regulieren.¹⁹⁰ Intrazelluläre Ligandenbindung des AR führt zur Translokation des Rezeptors in den Zellkern, wo über Interaktionen mit Kofaktoren an den Androgen-Response-Elementen der entsprechenden Zielgene die Genexpression reguliert wird.¹⁹¹ Der Entzug dieses Wachstumsstimulus ist bei fortgeschrittenem PCa ein effektiver Ansatz zur Verkleinerung der Tumorgroße und Verlängerung des Gesamtüberlebens, was jedoch bei fast allen Patienten mit der Zeit im Sinne einer Kastrationsrefrakterität zunehmend versagt.^{192,193} Bei Leukämien, dem Mammakarzinom und auch beim PCa scheint die exosomale Sekretion für die Entwicklung und Ausbreitung von Resistenzen gegenüber systemischen Therapien eine zu Rolle spielen.^{67–71} Daher ist es denkbar, dass die Mechanismen der exosomalen Sekretion am Versagen der Kastrationstherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem PCa beteiligt sind.

Um eine Beteiligung von *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* für die Entwicklung der Kastrationsrefrakterität zu beleuchten, wurde die jeweilige Genexpression in der TUR-Kohorte mittels RT-qPCR bestimmt: Bei PCa mit Zustand nach ADT (htPCa) zeigte sich eine signifikante Unterexpression von *VPS36* und eine Tendenz zur Unterexpression gegenüber hormonnativen Tumoren. Bei *RAB27A* und *RAB27B* lag jeweils keine differenzielle Expression bezüglich der ADT vor.

Zu Veränderungen der Expression von *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* durch eine hormonablativ Therapie beziehungsweise zu Zusammenhängen mit dem Versagen der ADT gibt es bislang kaum vergleichbare Studien. Shaw *et al.* stellten in Folge von Androgenentzug durch den GnRH-Antagonisten Degarelix eine Verringerung der Expression von *RAB27A* fest. Belege für eine *direkte* Verbindung zum Androgenrezeptor gibt es hier zwar nicht, allerdings scheint es eine AR-Bindungsstelle in der Promoter-Region von *RAB27A* zu geben. Für *RAB27B* und *VPS36*, die im dort verwendeten Microarray ebenfalls enthalten waren, stellte die Gruppe keine Expressionsveränderungen durch die ADT fest.¹⁸⁹

In der vorliegenden Arbeit wurde abweichend dazu keine veränderte Expression von *RAB27A*, dafür aber eine Unterexpression von *VPS36* in htPCa festgestellt. Die Studie von Shaw *et al.* ist zwar nur bedingt vergleichbar, da sie *frühe* Expressionsveränderungen *durch ADT* untersuchte, während die Patienten der Gruppe der htPCa aus der TUR-Kohorte *trotz ADT* eine transurethrale Resektion benötigten. Dennoch liefert sie einen Hinweis, dass es Verbindungen zwischen dem AR-Signalweg und der exosomalen Sekretion geben könnte.

Als möglicher Mechanismus für eine Beteiligung an der Entwicklung der Kastrationsrefrakterität wäre für *VPS36* als Teil des ESCRT ein Zusammenhang mit der exosomalen Sekretion zwar plausibel, jedoch hat der ESCRT auch in vielen anderen Bereichen, zum Beispiel bei Membranreparatur und Autophagie, Funktionen, die hier nicht untersucht wurden.¹⁴⁷ Weiterhin ist unklar, ob Veränderungen des ESCRT Ursache oder Effekt der Unabhängigkeit vom Androgenstimulus sind. Die Aussagekraft der Daten aus der TUR-Kohorte wird zudem durch die relativ geringe Fallzahl, die Heterogenität des Abstandes zwischen ADT und TUR und der verwendeten Medikamente zur ADT eingeschränkt. Um zu klären ob und wie *VPS36* an der Entwicklung von Kastrationsrefrakterität beteiligt ist, sind daher weitere Studien an größeren Patientenkohorten nötig. Für eine bessere kausale Einordnung könnten weiterhin Experimenten *in vitro* dienen, die z.B. androgensensible Zellen unter Androgenkarenz mit Exosomen kastrationsrefraktärer Zellen kultivieren und darunter mögliche Veränderungen von Migration und Invasivität beobachten.

AR im fortgeschrittenen Prostatakarzinom überexprimiert

In der TUR-Kohorte wurde im Rahmen der Korrelationsanalysen zusätzlich zu den drei Genen, die mit der exosomalen Sekretion assoziierten sind, die Expression von *AR* bestimmt. Hier zeigte sich eine Überexpression bei Malignität, höherem Grading nach Gleason und am deutlichsten bei Zustand nach ADT.

Für die von Androgenen unabhängige Krankheitsprogression sind bereits unterschiedliche Mechanismen wie aberrante Aktivierung, Umgehung des AR-Signalweges und Hypersensitivität gegenüber Androgenen durch erhöhte Empfindlichkeit oder Überexpression des Rezeptors bekannt.^{39, 190, 193, 194} Auch in der vorliegenden Studie wurde eine deutlich erhöhte Expression von *AR* bei Zustand nach ADT festgestellt. Dies ist als Mechanismus zur Steigerung der Sensitivität gegenüber Androgenen unter ADT bereits bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen entsprechend mit dem, was über die Tumorbilogie des PCa bereits bekannt ist, überein.

Die Studienlage bezüglich der Expression von *AR* im PCa gegenüber benignem Gewebe und Zusammenhängen mit dem Differenzierungsgrad ist heterogen. Einige Untersuchungen sehen eine Erhöhung der Expression von *AR* in PCa gegenüber benignem Gewebe,^{195–199} andere jedoch eine Verringerung.^{200–202} In Hinblick auf den Differenzierungsgrad ergibt sich ein ebenso uneinheitliches Bild. Es existieren sowohl Studien, die eine negative,^{201, 203–205} als auch Untersuchungen die eine positive Korrelation mit dem Grading nach Gleason zeigen.²⁰²

Die uneinheitliche Studienlage könnte dadurch bedingt sein, dass die Expression von *AR* *innerhalb* einzelner Tumoren eine erhebliche Heterogenität aufweist^{200, 201, 206–209} und die Kohorten der genannten Studien bezüglich des Differenzierungsgrades und Vortherapien unterschiedliche Zusammensetzungen aufweisen.

Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigt, dass die Überexpression von *AR* in der Gruppe der PCa vor allem durch die Proben der Patienten mit Zustand nach ADT bedingt zu sein scheint, da die Gruppe der hnPCa gegenüber den benignen Kontrollen keine veränderte Expression aufweist. Weiterhin gibt es Hinweise,

dass die AR-Expression mit sinkendem Differenzierungsgrad variabler wird.²⁰⁸ Dies zeigt sich auch in der vorliegenden Studie.

4.5 Limitationen der Studie

Die Beurteilbarkeit der Untersuchungsergebnisse wird teilweise durch die heterogene Zusammensetzung der einzelnen Patientenkohorten untereinander, die unterschiedlichen Messmethoden und Differenzen in der Verarbeitung der Proben eingeschränkt. Insbesondere die Population der TUR-Kohorte weist naturgemäß intern Heterogenität bzgl. iatrogener Faktoren wie Vorthherapie auf, beim verwendete FFPE-Material ist auch immer von einer gewissen Degradation der Nukleinsäuren auszugehen und die Akquise der klinischen Daten wurde durch unvollständige Aktenführung erschwert.

Als benignes Kontrollgewebe wurde Material aus transurethralen Resektionen von Patienten mit BPH verwendet. Es gibt Hinweise, dass auch bei diesen benignen Veränderungen des Drüsengewebes relevante Alterationen der Genexpression vorkommen.²⁰² Tatsächlich unverändertes Prostatagewebe wäre als Vergleichsziel geeigneter gewesen, ist jedoch schwieriger zu gewinnen.

Dennoch liefern die im Rahmen der vorliegenden Dissertation dargelegten Analysen wichtige Hinweise auf Einflüsse von Genen der exosomalen Sekretionsmaschinerie auf die Biologie des PCa, deren weitere Erforschung Fortschritte für Diagnostik und Therapie der Tumorerkrankung bringen könnten.

4.6 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Gene in Verbindung mit der exosomalen Sekretion hinsichtlich ihrer Bedeutung für das PCa betrachtet und drei davon, *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* noch genauer auf Zusammenhänge mit Erkrankungsentwicklung und Prognose untersucht.

Die gewonnenen Daten liefern einen Hinweis, dass eine verringerte Expression der drei Gene am Prozess der Metastasierung beteiligt sein könnte. Obwohl mögliche Grün-

de dafür vielfältig sind und insbesondere *VPS36* als Teil der ESCRT-Maschinerie an verschiedenen zellulären Funktionen beteiligt ist, scheint eine Verbindung mit der exosomalen Sekretion zumindest im Falle von *RAB27A* und *RAB27B* am plausibelsten. Die verringerte Expression impliziert hier eine *geringere* exosomale Sekretion, was auf Basis dessen, was aus vielen Tumorentitäten bekannt ist, kontraintuitiv scheint. In zukünftigen Untersuchungen sollte entsprechend geklärt werden, ob die Expressionsveränderungen die exosomale Sekretion von PCa-Zellen tatsächlich verringert oder nur *Subspezies* der Vesikel vermindert ausgeschüttet werden.

Weiterhin bedarf die Population der extrazellulären Vesikel in weiteren Studien einer differenzierteren Betrachtung: Angefangen bei der Tatsache, dass für den Begriff „Exosomen“ eine einheitliche Definition fehlt, scheint es sich bei den Vesikeln nicht um eine homogene Klasse zu handeln, sondern um funktionell differenzierte Subspezies.⁵⁴ Selbige weiter zu unterscheiden und zu charakterisieren ist von zentraler Bedeutung für ein besseres Verständnis der Mikrovesikel.

Auf Basis der vorliegenden Daten lässt sich die Frage, ob die drei untersuchten Gene einen Einfluss auf die *lokale* Tumorentwicklung oder das Gesamtüberleben haben, nicht abschließend klären. Hier sind weitere, größer angelegte Studien nötig, wobei aufgrund der häufig relativ langsamen Progression des PCa lange Untersuchungszeiträume zu wählen wären.

Weiterhin geben die Korrelationen der untersuchten Gene untereinander sowie die Assoziation zwischen *RAB27B* und *AR* Anhaltspunkte für regulative Zusammenhänge der Gene untereinander. Dies ist ebenfalls in weiteren Studien zu validieren.

5 Zusammenfassung

Aufgrund seiner hohen Prävalenz und Stellung als dritthäufigste Todesursache bei Männern in Deutschland besitzt das Prostatakarzinom eine erhebliche Bedeutung für das Gesundheitssystem. Die Therapieentscheidung bei potentiell kurablen Tumoren, sowie die optimale Therapieauswahl in metastasierten Stadien stellen zentrale Herausforderungen im klinischen Alltag dar. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen, sowie verlässliche molekulare Entscheidungshilfen sind notwendig, um die Versorgung der Patienten zu verbessern

Die Kommunikation von Tumorzellen mit dem benachbarten, aber auch weiter entfernten Gewebe ist für die Erkrankung von zentraler Bedeutung und neben löslichen Stoffen spielt eine Population von Mikrovesikeln endosomaler Herkunft, die Exosomen, hier eine Rolle. Über die Regulation der Sekretion von Exosomen im Prostatakarzinom ist bisher nur wenig bekannt und daher stellt sich die Frage, welche an der exosomalen Sekretion beteiligten Gene hier alteriert sind.

Mittels Literaturrecherche wurde ein Panel von mit der exosomalen Sekretion assoziierten Genen erstellt. Anhand von Korrelationen mit der Erkrankungsprogression, gemessen an der Zeit bis zum biochemischen Rezidiv, wurden auf Basis eines öffentlich verfügbaren Microarraydatensatzes *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* für detailliertere Analysen ausgewählt.

In zwei weiteren öffentlich verfügbaren Microarraydatensätzen und einer vor Ort akquirierten sowie einer kommerziell erhältlichen cDNA-Kohorte wurden Assoziationen mit dem lokalen Tumorstadium, der Gewebsdifferenzierung, der Metastasierung, dem Gesamtüberleben und Korrelationen der Genexpression überprüft.

Hier zeigte sich in den Microarraydatensätzen für *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* eine Unterexpression in metastatischen Proben und bei Zustand nach hormonablativer Therapie präsentierte sich *VPS36* unterexprimiert. Aufgrund ihrer Rolle in der exosomalen Sekretionsmaschinerie und der bisher vor allem als progressionsfördernd erkannten Bedeutung der Mikrovesikel für Tumorerkrankungen ist diese Unterexpression unerwartet. Konkret scheint bei einigen anderen Tumorentitäten eine *Überexpression* von *RAB27A* und *RAB27B* mit dem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert zu sein. Lediglich beim Kolonkarzinom gibt es Studien, die eine Unterexpression im Zusammenhang mit dem Erkrankungsprogress sehen. Dass die drei Gene im Prostatakarzinom herabreguliert sind, erscheint entsprechend plausibel, der Mechanismus dieses Einflusses muss jedoch weiter aufgeklärt werden. Möglicherweise spielt hier die Heterogenität der bisher eher als homogene Population wahrgenommenen Exosomen eine noch zu klärende Rolle.

Eine Assoziation der Expression der drei Kandidatengene mit lokalem Tumorstadium oder dem Grading nach Gleason konnten nicht festgestellt werden. Aufgrund mangelnder Datenpunkte konnte kein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben gezeigt werden. AR präsentierte sich, wie zu erwarten, in Proben mit Zustand nach Androgenentzug überexprimiert.

Die Korrelationsanalysen zeigten für *RAB27A*, *RAB27B* und *VPS36* Zusammenhänge der Expression untereinander sowie im Falle von *RAB27B* auch einen Zusammenhang mit der Expression von AR.

Obwohl noch weitere Untersuchungen nötig sind, um die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zu bestätigen und ihre Mechanismen aufzuklären, liefert diese Studie einen Beitrag zum besseren Verständnis der Tumorbilogie des Prostatakarzinoms und öffnet die Tür zu besserer Diagnostik und Therapie der Krebserkrankung etwas weiter.

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Entwicklung der Einträge zu „Exosomes“ bei PubMed zwischen 2000 und 2017 | 8 |
| 1.2 | Intrazelluläre Mechanismen der exosomalen Produktion | 10 |
| 2.1 | Studienablauf | 15 |
| 2.2 | Zusammensetzung der verwendeten Microarraydatensätze: Verteilung von Probenotypen, Gleason und T-Stadium | 20 |
| 2.3 | Zusammensetzung der verwendeten cDNA-Kohorten: Verteilung von Alter und Grading nach Gleason. | 22 |
| 2.4 | Berechnung relativer Expressionen für präexistierende Genexpressions-Datensätze | 25 |
| 3.1 | Zeit bis zum Biochemischen Rezidiv für ausgewählte Gene. | 37 |
| 3.2 | Expression von RAB27A, RAB27B und VPS36 bei benignen Proben, Gewebe aus Prostatakarzinomen und Metastasen | 40 |
| 3.3 | Expression von RAB27A, RAB27B, VPS36 abhängig vom Grading nach Gleason | 42 |
| 3.4 | Expression von RAB27A, RAB27B und VPS36 vor und nach Androgen-deprivationstherapie | 43 |
| 3.5 | Expression von AR in der TUR-Kohorte | 44 |
| 3.6 | Assoziation der Expression von RAB27A, RAB27B, VPS36 und AR mit dem Gesamtüberleben | 45 |
| 3.7 | Korrelationen von RAB27A, RAB27B, VPS36 und AR untereinander . . | 46 |
| 5.1 | Zeit bis zum Biochemischen Rezidiv abhängig von der Expression von Genen mit Rolle bei der exosomalen Sekretion. | 97 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Verwendete Primer | 27 |
| 2.2 | Verwendete PCR-Sonden | 28 |
| 2.3 | cDNA-Synthese-Ansatz für SuperScript-III | 30 |
| 2.4 | cDNA-Synthese-Mastermix für SuperScript-III | 30 |
| 2.5 | Versuchsansatz für qPCR mit SYBER-green | 31 |
| 2.6 | Versuchsansatz für qPCR mit Sonden | 31 |
| 3.1 | Initiales Panel von Genen mit Bedeutung für die exosomale Sekretion . . | 36 |
| 3.2 | Überlebensanalysen für Zeit bis BCR: Cutoff-Werte, Gruppengrößen und log-rank-Test | 38 |
| 4.1 | Einfluss von <i>RAB27A</i> und <i>RAB27B</i> bei verschiedenen Tumorentitäten . | 52 |
| 5.1 | Übersicht der für die Gruppenvergleiche gebildeten Gruppen | 91 |
| 5.2 | Gruppenvergleiche RAB27A - detaillierte Ergebnisse der statistischen Aus- wertung | 92 |
| 5.3 | Gruppenvergleiche RAB27B - detaillierte Ergebnisse der statistischen Aus- wertung | 93 |
| 5.4 | Gruppenvergleiche VPS36 - detaillierte Ergebnisse der statistischen Aus- wertung | 94 |
| 5.5 | Gruppenvergleiche AR - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung | 95 |
| 5.6 | Korrelationsanalysen - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung | 96 |

Literaturverzeichnis

- [1] P. Kaatsch, C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, J. Cernaj, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann, and K. Kranzhöfer, “Krebs in Deutschland 2009/2010,” tech. rep., Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, 2010.
- [2] E. D. Crawford, L. Black, M. Eaddy, and E. J. Kruep, “A retrospective analysis illustrating the substantial clinical and economic burden of prostate cancer.,” *Prostate cancer and prostatic diseases*, vol. 13, no. 2, pp. 162–167, 2010.
- [3] S. A. Eccles and D. R. Welch, “Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies.,” *Lancet (London, England)*, vol. 369, no. 9574, pp. 1742–1757, 2007.
- [4] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF), “Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 3.1,” 2016.
- [5] J.-E. Damber and G. Aus, “Prostate cancer.,” *Lancet*, vol. 371, no. 9625, pp. 1710–1721, 2008.
- [6] C. Vutuc, G. Haidinger, S. Madersbacher, I. Berger, and Z. Culig, “Prostatakarzinom - Epidemiologie in Österreich, Risikofaktoren, Pathologie, hormonelle Regulation und Tumorbiologie,” *Journal für Urologie und Urogynäkologie*, vol. 17, no. 2, pp. 12–20, 2010.
- [7] M. Hoda, A. Hamza, K. Fischer, S. Wagner, J. Schneider, H. Heynemann, and P. Fornara, “Übergewicht als Risikofaktor für das Prostatakarzinom: Rolle der Adipozytokine und Beteiligung der Tyrosinkinasen,” *Aktuelle Urologie*, vol. 41, pp. 178–183, may 2010.
- [8] O. Bratt, “Hereditary prostate cancer: clinical aspects.,” *The Journal of urology*, vol. 168, no. 3, pp. 906–913, 2002.
- [9] E. a. Klein, I. M. Thompson, C. M. Tangen, J. J. Crowley, M. S. Lucia, P. J. Goodman, L. M. Minasian, L. G. Ford, H. L. Parnes, J. M. Gaziano, D. D. Karp, M. M. Lieber, P. J. Walther, L. Klotz, J. K. Parsons, J. L. Chin, A. K. Darke, S. M. Lippman, G. E. Goodman, F. L. Meyskens, and L. H. Baker, “Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT).,” *JAMA*, vol. 306, pp. 1549–56, oct 2011.

- [10] G. Kramer, D. Mitteregger, and M. Marberger, “Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease?,” *European urology*, vol. 51, no. 5, pp. 1202–1216, 2007.
- [11] J. R. Packer and N. J. Maitland, “The molecular and cellular origin of human prostate cancer.,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1863, pp. 1238–60, jun 2016.
- [12] B. D. Hudson, K. S. Kulp, and G. G. Loots, “Prostate cancer invasion and metastasis: insights from mining genomic data.,” *Briefings in functional genomics*, vol. 12, no. 5, pp. 397–410, 2013.
- [13] D. Ilic, M. M. Neuberger, M. Djulbegovic, and P. Dahm, “Screening for prostate cancer.,” *The Cochrane database of systematic reviews*, p. CD004720, jan 2013.
- [14] A. Tawfik, “Prostate-Specific Antigen (PSA)-Based Population Screening for Prostate Cancer: An Economic Analysis.,” *Ontario health technology assessment series*, vol. 15, no. 11, pp. 1–37, 2015.
- [15] J. C. Weinreb, J. O. Barentsz, P. L. Choyke, F. Cornud, M. A. Haider, K. J. Macura, D. Margolis, M. D. Schnall, F. Shtern, C. M. Tempany, H. C. Thoeny, and S. Verma, “PI-RADS Prostate Imaging - Reporting and Data System: 2015, Version 2.,” *European urology*, vol. 69, pp. 16–40, jan 2016.
- [16] G. L. Horn, P. F. Hahn, S. Tabatabaei, and M. Harisinghani, “A practical primer on PI-RADS version 2: a pictorial essay.,” *Abdominal radiology (New York)*, vol. 41, pp. 899–906, may 2016.
- [17] J. I. Epstein, W. C. Allsbrook, M. B. Amin, and L. L. Egevad, “The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma.,” *The American journal of surgical pathology*, vol. 29, pp. 1228–42, sep 2005.
- [18] J. S. Jones, H. W. Follis, and J. R. Johnson, “Probability of finding T1a and T1b (incidental) prostate cancer during TURP has decreased in the PSA era.,” *Prostate cancer and prostatic diseases*, vol. 12, no. 1, pp. 57–60, 2009.
- [19] J. R. Prensner, M. A. Rubin, J. T. Wei, and A. M. Chinnaiyan, “Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers.,” *Science translational medicine*, vol. 4, p. 127rv3, mar 2012.
- [20] S. P. Balk, Y.-J. Ko, and G. J. Bubley, “Biology of prostate-specific antigen.,” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 21, no. 2, pp. 383–91, 2003.
- [21] S. J. Freedland, “Screening, risk assessment, and the approach to therapy in patients with prostate cancer,” *Cancer*, vol. 117, no. 6, pp. 1123–1135, 2011.

- [22] G. Draisma, R. Etzioni, A. Tsodikov, A. Mariotto, E. Wever, R. Gulati, E. Feuer, and H. De Koning, “Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: Importance of methods and context,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, no. 6, pp. 374–383, 2009.
- [23] F. J. Fowler, M. J. Barry, B. Walker-Corkery, J. F. Caubet, D. W. Bates, M. L. Jeong, A. Hauser, and M. McNaughton-Collins, “The impact of a suspicious prostate biopsy on patients’ psychological, socio-behavioral, and medical care outcomes,” *Journal of General Internal Medicine*, vol. 21, no. 7, pp. 715–721, 2006.
- [24] Z. Yang, L. Yu, and Z. Wang, “PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic biomarkers for prostate cancer.,” *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, vol. 28, pp. 65–71, feb 2016.
- [25] P. Sooriakumaran, D. P. Lovell, A. Henderson, P. Denham, S. E. M. Langley, and R. W. Laing, “Gleason scoring varies among pathologists and this affects clinical risk in patients with prostate cancer.,” *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, vol. 17, pp. 655–8, dec 2005.
- [26] I. Popa, Y. Fradet, G. Beaudry, H. Hovington, G. Beaudry, and B. Têtu, “Identification of PCA3 (DD3) in prostatic carcinoma by in situ hybridization.,” *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 20, no. 11, pp. 1121–7, 2007.
- [27] W. K. B. Ranasinghe, G. S. Baldwin, D. Bolton, A. Shulkes, J. Ischia, and O. Patel, “HIF1?? expression under normoxia in prostate cancer - Which pathways to target?,” *Journal of Urology*, vol. 193, no. 3, pp. 763–770, 2015.
- [28] S. J. Barfeld, P. East, V. Zuber, and I. G. Mills, “Meta-analysis of prostate cancer gene expression data identifies a novel discriminatory signature enriched for glycosylating enzymes.,” *BMC medical genomics*, vol. 7, p. 513, 2014.
- [29] H. G. Nguyen, C. J. Welty, and M. R. Cooperberg, “Diagnostic associations of gene expression signatures in prostate cancer tissue.,” *Current opinion in urology*, vol. 25, pp. 65–70, jan 2015.
- [30] R. B. Shah and M. Zhou, “Recent advances in prostate cancer pathology: Gleason grading and beyond.,” *Pathology international*, vol. 66, pp. 260–72, may 2016.
- [31] A. Amaro, A. I. Esposito, A. Gallina, M. Nees, G. Angelini, A. Albini, and U. Pfeffer, “Validation of proposed prostate cancer biomarkers with gene expression data: A long road to travel,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 33, no. 2-3, pp. 657–671, 2014.

- [32] P. C. Albertsen, J. A. Hanley, and J. Fine, “20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer.,” *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 293, no. 17, pp. 2095–2101, 2005.
- [33] J. E. Johansson, H. O. Adami, S. O. Andersson, R. Bergström, U. B. Krusemo, and W. Kraaz, “Natural history of localised prostatic cancer. A population-based study in 223 untreated patients.,” *Lancet (London, England)*, vol. 1, pp. 799–803, apr 1989.
- [34] W. T. Lowrance, J. A. Eastham, C. Savage, A. C. Maschino, V. P. Laudone, C. B. Dechet, R. A. Stephenson, P. T. Scardino, and J. S. Sandhu, “Contemporary open and robotic radical prostatectomy practice patterns among urologists in the United States.,” *The Journal of urology*, vol. 187, pp. 2087–92, jun 2012.
- [35] C. Bolenz, S. J. Freedland, B. K. Hollenbeck, Y. Lotan, W. T. Lowrance, J. B. Nelson, and J. C. Hu, “Costs of radical prostatectomy for prostate cancer: a systematic review.,” *European urology*, vol. 65, pp. 316–24, feb 2014.
- [36] H. W. Herr and M. O’Sullivan, “Quality of life of asymptomatic men with nonmetastatic prostate cancer on androgen deprivation therapy.,” *The Journal of urology*, vol. 163, pp. 1743–6, jun 2000.
- [37] H. Ahmadi and S. Daneshmand, “Androgen deprivation therapy: evidence-based management of side effects.,” *BJU international*, vol. 111, pp. 543–8, apr 2013.
- [38] N. Fujimoto, “Novel agents for castration-resistant prostate cancer: Early experience and beyond.,” *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, 2015.
- [39] T. Visakorpi, E. Hyytinen, P. Koivisto, M. Tanner, R. Keinänen, C. Palmberg, A. Palotie, T. Tammela, J. Isola, and O. P. Kallioniemi, “In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer.,” *Nature genetics*, vol. 9, no. 4, pp. 401–406, 1995.
- [40] Z. Culig, A. Hobisch, M. V. Cronauer, A. C. Cato, A. Hittmair, C. Radmayr, J. Eberle, G. Bartsch, and H. Klocker, “Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone.,” *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, vol. 7, no. 12, pp. 1541–1550, 1993.
- [41] Z. Culig, A. Hobisch, M. V. Cronauer, C. Radmayr, J. Trapman, A. Hittmair, G. Bartsch, and H. Klocker, “Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor and epidermal growth factor.,” *European urology*, vol. 27 Suppl 2, pp. 45–47, 1995.

- [42] N. Craft, Y. Shostak, M. Carey, and C. L. Sawyers, “A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase.,” *Nature medicine*, vol. 5, no. 3, pp. 280–285, 1999.
- [43] V. J. Gnanapragasam, H. Y. Leung, a. S. Pulimood, D. E. Neal, and C. N. Robson, “Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer.,” *British journal of cancer*, vol. 85, no. 12, pp. 1928–1936, 2001.
- [44] C. Villarroja-Beltri, F. Baixauli, C. Gutiérrez-Vázquez, F. Sánchez-Madrid, and M. Mittelbrunn, “Sorting it out: Regulation of exosome loading.,” *Seminars in cancer biology*, apr 2014.
- [45] S. Haen, P. Brossart, and H.-G. Rammensee, “Tumorstabilisierung,” *Der Onkologe*, vol. 18, pp. 795–800, sep 2012.
- [46] P. Kharaziha, S. Ceder, Q. Li, and T. Panaretakis, “Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle.,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1826, pp. 103–111, aug 2012.
- [47] A. V. Vlassov, S. Magdaleno, R. Setterquist, and R. Conrad, “Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1820, no. 7, pp. 940–948, 2012.
- [48] S. J. Gould and G. Raposo, “As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles.,” *Journal of extracellular vesicles*, vol. 2, 2013.
- [49] J. Kowal, M. Tkach, and C. Théry, “Biogenesis and secretion of exosomes.,” *Current opinion in cell biology*, vol. 29, pp. 116–25, aug 2014.
- [50] L. T. Brinton, H. S. Sloane, M. Kester, and K. a. Kelly, “Formation and role of exosomes in cancer.,” *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2014.
- [51] D. M. Pegtel, M. D. B. van de Garde, and J. M. Middeldorp, “Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion,” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1809, no. 11-12, pp. 715–721, 2011.
- [52] M. Colombo, C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L. F. Moita, C. Thery, and G. Raposo, “Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles,” *J Cell Sci*, vol. 126, no. Pt 24, pp. 5553–5565, 2013.
- [53] M. Ostrowski, N. B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C. F. Moita, K. Schauer, A. N. Hume, R. P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N. Hacohen, M. Fukuda, C. Desnos, M. C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L. F. Moita, and C. Thery, “Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway.,” *Nature cell biology*, vol. 12, pp. 19–30; sup pp 1–13, jan 2010.

- [54] A. Bobrie and C. Théry, “Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal?,” *Biochemical Society transactions*, vol. 41, pp. 263–7, feb 2013.
- [55] H. Peinado, M. Alečković, S. Lavotshkin, I. Matei, B. Costa-Silva, G. Moreno-Bueno, M. Hergueta-Redondo, C. Williams, G. García-Santos, C. Ghajar, A. Nitadori-Hoshino, C. Hoffman, K. Badal, B. A. Garcia, M. K. Callahan, J. Yuan, V. R. Martins, J. Skog, R. N. Kaplan, M. S. Brady, J. D. Wolchok, P. B. Chapman, Y. Kang, J. Bromberg, and D. Lyden, “Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET.,” *Nature medicine*, vol. 18, pp. 883–91, jun 2012.
- [56] C. Théry, L. Zitvogel, and S. Amigorena, “Exosomes: composition, biogenesis and function.,” *Nature reviews. Immunology*, vol. 2, pp. 569–79, aug 2002.
- [57] J. A. Tickner, A. J. Urquhart, S.-A. Stephenson, D. J. Richard, and K. J. O’Byrne, “Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer.,” *Frontiers in oncology*, vol. 4, p. 127, jan 2014.
- [58] J. P. Webber, L. K. Spary, A. J. Sanders, R. Chowdhury, W. G. Jiang, R. Steadman, J. Wymant, A. T. Jones, H. Kynaston, M. D. Mason, Z. Tabi, and A. Clayton, “Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes,” *Oncogene*, vol. 34, pp. 1–13, jan 2014.
- [59] J. Skog, T. Würdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Curry, B. S. Carter, A. M. Krichevsky, and X. O. Breakefield, “Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers.,” *Nature cell biology*, vol. 10, pp. 1470–6, dec 2008.
- [60] D. Hoshino, K. Kirkbride, K. Costello, E. Clark, S. Sinha, N. Grega-Larson, M. Tyska, and A. Weaver, “Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior,” *Cell Reports*, vol. 5, no. 5, pp. 1159–1168, 2013.
- [61] S. Yu, C. Liu, K. Su, J. Wang, Y. Liu, L. Zhang, C. Li, Y. Cong, R. Kimberly, W. E. Grizzle, C. Falkson, and H.-G. Zhang, “Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 178, no. 11, pp. 6867–6875, 2007.
- [62] R. Valenti, V. Huber, M. Iero, P. Filipazzi, G. Parmiani, and L. Rivoltini, “Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression,” 2007.
- [63] D. K. Jeppesen, A. Nawrocki, S. G. Jensen, K. Thorsen, B. Whitehead, K. A. Howard, L. Dyrskjöt, T. F. Ørntoft, M. R. Larsen, and M. S. Ostensfeld, “Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic

- and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors.,” *Proteomics*, vol. 14, pp. 699–712, mar 2014.
- [64] N. Tominaga, N. Kosaka, M. Ono, T. Katsuda, Y. Yoshioka, K. Tamura, J. Lötval, H. Nakagama, and T. Ochiya, “Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier.,” *Nature communications*, vol. 6, p. 6716, apr 2015.
- [65] Z. Y. Abd Elmageed, Y. Yang, R. Thomas, M. Ranjan, D. Mondal, K. Moroz, Z. Fang, B. M. Rezk, K. Moparty, S. C. Sikka, O. Sartor, and A. B. Abdel-Mageed, “Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes.,” *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 32, pp. 983–97, apr 2014.
- [66] C. Federici, F. Petrucci, S. Caimi, A. Cesolini, M. Logozzi, M. Borghi, S. D’Ilio, L. Lugini, N. Violante, T. Azzarito, C. Majorani, D. Brambilla, and S. Fais, “Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin.,” *PloS one*, vol. 9, p. e88193, jan 2014.
- [67] M. Bebawy, V. Combes, E. Lee, R. Jaiswal, J. Gong, A. Bonhoure, and G. E. R. Grau, “Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells.,” *Leukemia*, vol. 23, pp. 1643–9, sep 2009.
- [68] W.-x. Chen, X.-m. Liu, M.-m. Lv, L. Chen, J.-h. Zhao, S.-l. Zhong, M.-h. Ji, Q. Hu, Z. Luo, J.-z. Wu, and J.-h. Tang, “Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs.,” *PloS one*, vol. 9, p. e95240, jan 2014.
- [69] J. Xu, W. Li, S. Zhong, X. Li, Z. Chen, Q. Hu, J. Tang, and J. Zhao, “Extraction and identification of exosomes from drug-resistant breast cancer cells and their potential role in cell-to-cell drug-resistance transfer,” *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*, vol. 36, pp. 165–70, mar 2014.
- [70] M.-M. Lv, X.-Y. Zhu, W.-X. Chen, S.-L. Zhong, Q. Hu, T.-F. Ma, J. Zhang, L. Chen, J.-H. Tang, and J.-H. Zhao, “Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein.,” *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, jul 2014.
- [71] C. Corcoran, S. Rani, K. O’Brien, A. O’Neill, M. Prencipe, R. Sheikh, G. Webb, R. McDermott, W. Watson, J. Crown, and L. O’Driscoll, “Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e50999, 2012.

- [72] D. Duijvesz, T. Luider, C. H. Bangma, and G. Jenster, “Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer,” *Eur Urol*, vol. 59, no. 5, pp. 823–831, 2011.
- [73] J. Nilsson, J. Skog, A. Nordstrand, V. Baranov, L. Mincheva-Nilsson, X. O. Breakefield, and A. Widmark, “Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer,” *Br J Cancer*, vol. 100, no. 10, pp. 1603–1607, 2009.
- [74] K. Mizutani, R. Terazawa, K. Kameyama, T. Kato, K. Horie, T. Tsuchiya, K. Seike, H. Ehara, Y. Fujita, K. Kawakami, M. Ito, and T. Deguchi, “Isolation of prostate cancer-related exosomes,” *Anticancer research*, vol. 34, pp. 3419–23, jul 2014.
- [75] P. J. Mitchell, J. Welton, J. Staffurth, J. Court, M. D. Mason, Z. Tabi, and A. Clayton, “Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer?,” *Journal of translational medicine*, vol. 7, p. 4, jan 2009.
- [76] S. Hao, Y. Liu, J. Yuan, X. Zhang, T. He, X. Wu, Y. Wei, D. Sun, and J. Xiang, “Novel exosome-targeted CD4+ T cell vaccine counteracting CD4+25+ regulatory T cell-mediated immune suppression and stimulating efficient central memory CD8+ CTL responses,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 179, no. 5, pp. 2731–2740, 2007.
- [77] B. Escudier, T. Dorval, N. Chaput, F. André, M.-P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboulleire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J.-B. Le Pecq, A. Spatz, O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin, and L. Zitvogel, “Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial,” *Journal of translational medicine*, vol. 3, p. 10, 2005.
- [78] M. A. Morse, J. Garst, T. Osada, S. Khan, A. Hobeika, T. M. Clay, N. Valente, R. Shreenivas, M. A. Sutton, A. Delcayre, D.-H. Hsu, J.-B. Le Pecq, and H. K. Lyerly, “A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer,” *Journal of translational medicine*, vol. 3, p. 9, 2005.
- [79] S. Dai, D. Wei, Z. Wu, X. Zhou, X. Wei, H. Huang, and G. Li, “Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer,” *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 16, pp. 782–90, apr 2008.
- [80] B. S. Taylor, N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T. Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers, and W. L. Gerald, “Integrative genomic profiling of human prostate cancer,” *Cancer cell*, vol. 18, pp. 11–22, jul 2010.

- [81] National Center for Biotechnology Information, “NCBI PubMed.” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Zugriff am 21.05.2015.
- [82] Deutsche Zentralbibliothek für Medizin, “MEDPILOT.” <http://medpilot.de/>. Zugriff am 21.05.2015.
- [83] E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A. P. Goldberg, C. Sander, and N. Schultz, “The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data,” *Cancer Discovery*, vol. 2, pp. 401–404, may 2012.
- [84] J. Gao, B. A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S. O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander, and N. Schultz, “Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal,” *Science signaling*, vol. 6, p. pl1, apr 2013.
- [85] R. Edgar, M. Domrachev, and A. E. Lash, “Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository,” *Nucleic acids research*, vol. 30, pp. 207–10, jan 2002.
- [86] Y. P. Yu, D. Landsittel, L. Jing, J. Nelson, B. Ren, L. Liu, C. McDonald, R. Thomas, R. Dhir, S. Finkelstein, G. Michalopoulos, M. Becich, and J.-H. Luo, “Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy,” *Journal of clinical oncology*, vol. 22, pp. 2790–9, jul 2004.
- [87] U. R. Chandran, C. Ma, R. Dhir, M. Bisceglia, M. Lyons-Weiler, W. Liang, G. Michalopoulos, M. Becich, and F. A. Monzon, “Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process,” *BMC cancer*, vol. 7, p. 64, jan 2007.
- [88] S. a. Tomlins, R. Mehra, D. R. Rhodes, X. Cao, L. Wang, S. M. Dhanasekaran, S. Kalyanasundaram, J. T. Wei, M. a. Rubin, K. J. Pienta, R. B. Shah, and A. M. Chinnaiyan, “Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression,” *Nature genetics*, vol. 39, pp. 41–51, jan 2007.
- [89] Ensembl Project, “cDNA-sequence: RAB27A-001 ENST00000396307.” www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000069974;r=15:55495164-55611311;t=ENST00000396307. Zugriff am 21.05.2015.
- [90] Ensembl Project, “cDNA-sequence: RAB27B-001 ENST00000262094.” www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000041353;r=18:52385091-52562747;t=ENST00000262094. Zugriff am 21.05.2015.

- [91] Ensembl Project, “cDNA-sequence: VPS36-001 ENST00000378060.” www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000136100;r=13:52986737-53024763;t=ENST00000378060. Zugriff am 21.05.2015.
- [92] A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, and S. G. Rozen, “Primer3—new capabilities and interfaces.,” *Nucleic acids research*, vol. 40, p. e115, aug 2012.
- [93] National Center for Biotechnology Information, “NCBI Primer BLAST.” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Zugriff am 21.05.2014.
- [94] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.,” *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 25, pp. 402–8, dec 2001.
- [95] C. Langelier, U. K. von Schwedler, R. D. Fisher, I. De Domenico, P. L. White, C. P. Hill, J. Kaplan, D. Ward, and W. I. Sundquist, “Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release.,” *Journal of virology*, vol. 80, no. 19, pp. 9465–80, 2006.
- [96] M. A. Rubin, M. Zhou, S. M. Dhanasekaran, S. Varambally, T. R. Barrette, M. G. Sanda, K. J. Pienta, D. Ghosh, and A. M. Chinnaiyan, “alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer.,” *JAMA*, vol. 287, pp. 1662–70, apr 2002.
- [97] C. A. Heinlein and C. Chang, “Androgen receptor (AR) coregulators: an overview.,” *Endocrine reviews*, vol. 23, no. 2, pp. 175–200, 2002.
- [98] S. Varambally, S. M. Dhanasekaran, M. Zhou, T. R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M. G. Sanda, D. Ghosh, K. J. Pienta, R. G. A. B. Sewalt, A. P. Otte, M. A. Rubin, and A. M. Chinnaiyan, “The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer.,” *Nature*, vol. 419, pp. 624–9, oct 2002.
- [99] M. J. Bussemakers, A. van Bokhoven, G. W. Verhaegh, F. P. Smit, H. F. Karthaus, J. A. Schalken, F. M. Debruyne, N. Ru, and W. B. Isaacs, “DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer.,” *Cancer research*, vol. 59, pp. 5975–9, dec 1999.
- [100] J. B. de Kok, G. W. Verhaegh, R. W. Roelofs, D. Hessels, L. A. Kiemeny, T. W. Aalders, D. W. Swinkels, and J. A. Schalken, “DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors.,” *Cancer research*, vol. 62, no. 9, pp. 2695–8, 2002.
- [101] C. Soekmadji, P. J. Russell, and C. C. Nelson, “Exosomes in prostate cancer: putting together the pieces of a puzzle.,” *Cancers*, vol. 5, pp. 1522–44, jan 2013.

- [102] T. Liu, D. E. Mendes, and C. E. Berkman, "Functional prostate-specific membrane antigen is enriched in exosomes from prostate cancer cells.," *International journal of oncology*, vol. 44, pp. 918–22, mar 2014.
- [103] J. Li, C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliaresis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler, and R. Parsons, "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 275, pp. 1943–7, mar 1997.
- [104] S. a. Tomlins, D. R. Rhodes, S. Perner, S. M. Dhanasekaran, R. Mehra, X.-W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J. E. Montie, R. B. Shah, K. J. Pienta, M. a. Rubin, and A. M. Chinnaiyan, "Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 310, pp. 644–8, oct 2005.
- [105] M. Babst, G. Odorizzi, E. J. Estepa, and S. D. Emr, "Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking.," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 1, no. 3, pp. 248–58, 2000.
- [106] N. Bishop and P. Woodman, "TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 15, pp. 11735–42, 2001.
- [107] S. W. Eastman, J. Martin-Serrano, W. Chung, T. Zang, and P. D. Bieniasz, "Identification of human VPS37C, a component of endosomal sorting complex required for transport-I important for viral budding.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 1, pp. 628–36, 2005.
- [108] E. Morita, V. Sandrin, S. L. Alam, D. M. Eckert, S. P. Gygi, and W. I. Sundquist, "Identification of human MVB12 proteins as ESCRT-I subunits that function in HIV budding.," *Cell host & microbe*, vol. 2, no. 1, pp. 41–53, 2007.
- [109] F. Stefani, L. Zhang, S. Taylor, J. Donovan, S. Rollinson, A. Doyotte, K. Brownhill, J. Benion, S. Pickering-Brown, and P. Woodman, "UBAP1 is a component of an endosome-specific ESCRT-I complex that is essential for MVB sorting.," *Current biology : CB*, vol. 21, no. 14, pp. 1245–50, 2011.
- [110] M. F. Baietti, Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, Y. Ivarsson, F. Depoortere, C. Coomans, E. Vermeiren, P. Zimmermann, and G. David, "Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes," *Nature Cell Biology*, vol. 14, no. 7, pp. 677–685, 2012.

- [111] N. Jouvenet, “Dynamics of ESCRT proteins,” *Cell Mol Life Sci*, vol. 69, no. 24, pp. 4121–4133, 2012.
- [112] T. Hasegawa, M. Konno, T. Baba, N. Sugeno, A. Kikuchi, M. Kobayashi, E. Miura, N. Tanaka, K. Tamai, K. Furukawa, H. Arai, F. Mori, K. Wakabayashi, M. Aoki, Y. Itoyama, and A. Takeda, “The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of α -synuclein,” *PloS one*, vol. 6, no. 12, p. e29460, 2011.
- [113] W. M. Henne, N. J. Buchkovich, and S. D. Emr, “The ESCRT pathway,” *Dev Cell*, vol. 21, no. 1, pp. 77–91, 2011.
- [114] M. Logozzi, A. De Mito, L. Lugini, M. Borghi, L. Calabrò, M. Spada, M. Perdicchio, M. L. Marino, C. Federici, E. Iessi, D. Brambilla, G. Venturi, F. Lozupone, M. Santinami, V. Huber, M. Maio, L. Rivoltini, and S. Fais, “High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients,” *PloS one*, vol. 4, p. e5219, jan 2009.
- [115] A. Ramteke, H. Ting, C. Agarwal, S. Mateen, R. Somasagara, A. Hussain, M. Graner, B. Frederick, R. Agarwal, and G. Deep, “Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules,” *Molecular carcinogenesis*, pp. 1–12, dec 2013.
- [116] J. H. Hurley and G. Odorizzi, “Get on the exosome bus with ALIX,” *Nat Cell Biol*, vol. 14, no. 7, pp. 654–655, 2012.
- [117] S. R. Pfeffer, “Two Rabs for exosome release,” *Nature cell biology*, vol. 12, no. 1, pp. 3–4, 2010.
- [118] A. Hendrix, G. Braems, M. Bracke, M. Seabra, W. Gahl, O. De Wever, and W. Westbroek, “The secretory small GTPase Rab27B as a marker for breast cancer progression,” *Oncotarget*, vol. 1, pp. 304–8, aug 2010.
- [119] W. Li, Y. Hu, T. Jiang, Y. Han, G. Han, J. Chen, and X. Li, “Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64,” *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, pp. 1–8, mar 2014.
- [120] A. Beach, H.-G. Zhang, M. Z. Ratajczak, and S. S. Kakar, “Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer,” *Journal of ovarian research*, vol. 7, p. 14, jan 2014.
- [121] J. Silva, V. Garcia, M. Rodriguez, M. Compte, E. Cisneros, P. Veguillas, J. M. Garcia, G. Dominguez, Y. Campos-Martin, J. Cuevas, C. Pena, M. Herrera, R. Diaz, N. Mohammed, and F. Bonilla, “Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer,” *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 51, no. 4, pp. 409–418, 2012.

- [122] S. Phuyal, N. P. Hessvik, T. Skotland, K. Sandvig, and A. Llorente, “Regulation of Exosome Release by Glycosphingolipids and Flotillins.,” *The FEBS journal*, pp. 1–14, mar 2014.
- [123] F. Thuma and M. Zöller, “Outsmart tumor exosomes to steal the cancer initiating cell its niche.,” *Seminars in cancer biology*, mar 2014.
- [124] F. M. Jhaveri, C. D. Zippe, E. A. Klein, and P. A. Kupelian, “Biochemical failure does not predict overall survival after radical prostatectomy for localized prostate cancer: 10-year results.,” *Urology*, vol. 54, pp. 884–90, nov 1999.
- [125] W. B. Roberts and M. Han, “Clinical significance and treatment of biochemical recurrence after definitive therapy for localized prostate cancer,” *Surgical Oncology*, vol. 18, no. 3, pp. 268–274, 2009.
- [126] O. M. Darwish and G. V. Raj, “Management of biochemical recurrence after primary localized therapy for prostate cancer.,” *Frontiers in oncology*, vol. 2, no. May, p. 48, 2012.
- [127] C. J. Paller and E. S. Antonarakis, “Management of biochemically recurrent prostate cancer after local therapy: evolving standards of care and new directions.,” *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*, vol. 11, pp. 14–23, jan 2013.
- [128] M. Fukuda, “Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways.,” *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 14, pp. 949–63, sep 2013.
- [129] J. B. Pereira-Leal and M. C. Seabra, “Evolution of the rab family of small GTP-binding proteins,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 313, pp. 889–901, nov 2001.
- [130] M. Zerial and H. McBride, “No Title,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, pp. 107–117, feb 2001.
- [131] S. R. Pfeffer, “Structural Clues to Rab GTPase Functional Diversity,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, pp. 15485–15488, apr 2005.
- [132] A. Savina, M. Vidal, and M. I. Colombo, “The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11.,” *Journal of cell science*, vol. 115, pp. 2505–15, jun 2002.
- [133] C. Hsu, Y. Morohashi, S.-I. Yoshimura, N. Manrique-Hoyos, S. Jung, M. A. Lauterbach, M. Bakhti, M. Grønberg, W. Möbius, J. Rhee, F. A. Barr, and M. Simons, “Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C.,” *The Journal of cell biology*, vol. 189, pp. 223–32, apr 2010.
- [134] W.-W. Dong, Q. Mou, J. Chen, J.-T. Cui, W.-M. Li, and W.-H. Xiao, “Differential expression of Rab27A/B correlates with clinical outcome in hepatocellular carcinoma.,” *World journal of gastroenterology : WJG*, vol. 18, pp. 1806–13, apr 2012.

- [135] C. Shi, X. Yang, Y. Ni, N. Hou, L. Xu, F. Zhan, H. Zhu, L. Xiong, and P. Chen, “High Rab27A expression indicates favorable prognosis in CRC.,” *Diagnostic pathology*, vol. 10, p. 68, 2015.
- [136] J. Bao, Y. Ni, H. Qin, L. Xu, Z. Ge, F. Zhan, H. Zhu, J. Zhao, X. Zhou, X. Tang, and L. Tang, “Rab27b is a potential predictor for metastasis and prognosis in colorectal cancer.,” *Gastroenterology research and practice*, vol. 2014, p. 913106, 2014.
- [137] V. Montel, T.-Y. Huang, E. Mose, K. Pestonjamas, and D. Tarin, “Expression profiling of primary tumors and matched lymphatic and lung metastases in a xenogeneic breast cancer model.,” *The American journal of pathology*, vol. 166, pp. 1565–79, may 2005.
- [138] W. Dong, J. Cui, J. Yang, W. Li, S. Wang, X. Wang, X. Li, Y. Lu, and W. Xiao, “Decreased expression of Rab27A and Rab27B correlates with metastasis and poor prognosis in colorectal cancer.,” *Discovery medicine*, vol. 20, pp. 357–67, dec 2015.
- [139] J. L. Johnson, B. A. Ellis, D. Noack, M. C. Seabra, and S. D. Catz, “The Rab27a-binding protein, JFC1, regulates androgen-dependent secretion of prostate-specific antigen and prostatic-specific acid phosphatase.,” *The Biochemical journal*, vol. 391, pp. 699–710, nov 2005.
- [140] S. D. Catz, “Characterization of Rab27a and JFC1 as constituents of the secretory machinery of prostate-specific antigen in prostate carcinoma cells.,” *Methods in enzymology*, vol. 438, pp. 25–40, 2008.
- [141] C. Griscelli, A. Durandy, D. Guy-Grand, F. Daguillard, C. Herzog, and M. Prunieras, “A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency.,” *The American journal of medicine*, vol. 65, pp. 691–702, oct 1978.
- [142] G. Ménasché, E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulffraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist, and G. de Saint Basile, “Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome.,” *Nature genetics*, vol. 25, pp. 173–6, jun 2000.
- [143] O. Schmidt and D. Teis, “The ESCRT machinery.,” *Current biology : CB*, vol. 22, pp. R116–20, feb 2012.
- [144] A. L. Schuh and A. Audhya, “The ESCRT machinery: from the plasma membrane to endosomes and back again.,” *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 49, no. 3, pp. 242–61, 2014.
- [145] J. G. Carlton and J. Martin-Serrano, “Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery.,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 316, pp. 1908–12, jun 2007.

- [146] E. Morita, V. Sandrin, H.-Y. Chung, S. G. Morham, S. P. Gygi, C. K. Rodesch, and W. I. Sundquist, “Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis.,” *The EMBO journal*, vol. 26, pp. 4215–27, oct 2007.
- [147] J. H. Hurley, “ESCRTs are everywhere.,” *The EMBO journal*, vol. 34, pp. 2398–407, oct 2015.
- [148] M. Shen, L. Qu, M. Ma, T. Dou, J. Lu, J. Guo, Y. Hu, G. Yi, J. Yuan, C. Sun, K. Wang, and N. Yang, “Genome-Wide Association Studies for Comb Traits in Chickens.,” *PloS one*, vol. 11, no. 7, p. e0159081, 2016.
- [149] H. Wang, Y. Zhao, C. Zhang, M. Li, C. Jiang, and Y. Li, “Rab27a was identified as a prognostic biomaker by mRNA profiling, correlated with malignant progression and subtype preference in gliomas,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 2, 2014.
- [150] X. Wu, A. Hu, M. Zhang, and Z. Chen, “Effects of Rab27a on proliferation, invasion, and anti-apoptosis in human glioma cell.,” *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, vol. 34, pp. 2195–203, aug 2013.
- [151] A. Hendrix and O. De Wever, “Rab27 GTPases distribute extracellular nanomaps for invasive growth and metastasis: implications for prognosis and treatment.,” *International journal of molecular sciences*, vol. 14, pp. 9883–92, jan 2013.
- [152] J.-S. Wang, F.-B. Wang, Q.-G. Zhang, Z.-Z. Shen, and Z.-M. Shao, “Enhanced expression of Rab27A gene by breast cancer cells promoting invasiveness and the metastasis potential by secretion of insulin-like growth factor-II.,” *Molecular cancer research : MCR*, vol. 6, pp. 372–382, mar 2008.
- [153] J.-X. Zhang, X.-X. Huang, M.-B. Cai, Z.-T. Tong, J.-W. Chen, D. Qian, Y.-J. Liao, H.-X. Deng, D.-Z. Liao, M.-Y. Huang, Y.-X. Zeng, D. Xie, and S.-J. Mai, “Overexpression of the secretory small GTPase Rab27B in human breast cancer correlates closely with lymph node metastasis and predicts poor prognosis.,” *Journal of translational medicine*, vol. 10, p. 242, 2012.
- [154] A. Hendrix, D. Maynard, P. Pauwels, G. Braems, H. Denys, R. Van den Broecke, J. Lambert, S. Van Belle, V. Cocquyt, C. Gespach, M. Bracke, M. C. Seabra, W. a. Gahl, O. De Wever, and W. Westbroek, “Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis.,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 102, pp. 866–80, jun 2010.
- [155] U. D. Akavia, O. Litvin, J. Kim, F. Sanchez-Garcia, D. Kotliar, H. C. Causton, P. Pochanard, E. Mozes, L. a. Garraway, and D. Pe’er, “An Integrated Approach to Uncover Drivers of Cancer,” *Cell*, vol. 143, pp. 1005–1017, dec 2010.

- [156] Y. Pu, F. Zhao, W. Cai, X. Meng, Y. Li, and S. Cai, “MiR-193a-3p and miR-193a-5p suppress the metastasis of human osteosarcoma cells by down-regulating Rab27B and SRR, respectively,” *Clinical & experimental metastasis*, vol. 33, pp. 359–372, apr 2016.
- [157] P. Ren, X.-Q. Yang, X.-L. Zhai, Y.-Q. Zhang, and J.-F. Huang, “Overexpression of Rab27B is correlated with distant metastasis and poor prognosis in ovarian cancer.,” *Oncology letters*, vol. 12, pp. 1539–1545, aug 2016.
- [158] H. Zhao, Q. Wang, X. Wang, H. Zhu, S. Zhang, W. Wang, Z. Wang, and J. Huang, “Correlation Between RAB27B and p53 Expression and Overall Survival in Pancreatic Cancer.,” *Pancreas*, vol. 45, pp. 204–210, feb 2016.
- [159] M. S. Ostensfeld, D. K. Jeppesen, J. R. Laurberg, A. T. Boysen, J. B. Bramsen, B. Primdal-Bengtson, A. Hendrix, P. Lamy, F. Dagnaes-hansen, M. H. Rasmussen, K. H. Bui, N. Fristrup, E. I. Christensen, I. Nordentoft, J. P. Morth, J. B. J. B. Jensen, J. S. Pedersen, M. Beck, D. Theodorescu, M. Borre, K. A. Howard, L. Dyrskjot, L. Dyrskjot, and T. F. Orntoft, “Cellular Disposal of miR23b by RAB27-Dependent Exosome Release Is Linked to Acquisition of Metastatic Properties,” *Cancer research*, vol. 74, pp. 5758–5772, oct 2014.
- [160] Q. Wang, Q. Ni, X. Wang, H. Zhu, Z. Wang, and J. Huang, “High expression of RAB27A and TP53 in pancreatic cancer predicts poor survival.,” *Medical oncology (Northwood, London, England)*, vol. 32, p. 372, jan 2015.
- [161] P. Amornphimoltham, K. Rechache, J. Thompson, A. Masedunskas, K. Leelahavanichkul, V. Patel, A. Molinolo, J. S. Gutkind, and R. Weigert, “Rab25 regulates invasion and metastasis in head and neck cancer.,” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 19, pp. 1375–88, mar 2013.
- [162] M. Tong, K. W. Chan, J. Y. J. Bao, K. Y. Wong, J.-N. Chen, P. S. Kwan, K. H. Tang, L. Fu, Y.-R. Qin, S. Lok, X.-Y. Guan, and S. Ma, “Rab25 is a tumor suppressor gene with antiangiogenic and anti-invasive activities in esophageal squamous cell carcinoma.,” *Cancer research*, vol. 72, pp. 6024–35, nov 2012.
- [163] J. Zhang, J. Wei, J. Lu, Z. Tong, B. Liao, B. Yu, F. Zheng, X. Huang, Z. Chen, Y. Fang, B. Li, W. Chen, D. Xie, and J. Luo, “Overexpression of Rab25 contributes to metastasis of bladder cancer through induction of epithelial-mesenchymal transition and activation of Akt/GSK-3 β /Snail signaling.,” *Carcinogenesis*, vol. 34, pp. 2401–8, oct 2013.
- [164] A. Bobrie, S. Krumeich, F. Rey, C. Recchi, L. F. Moita, M. C. Seabra, M. Ostrowski, and C. Théry, “Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression.,” *Cancer research*, vol. 72, pp. 4920–30, oct 2012.

- [165] J. Blümer, J. Rey, L. Dehmelt, T. Mazel, Y.-W. Wu, P. Bastiaens, R. S. Goody, and A. Itzen, “RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting,” *The Journal of cell biology*, vol. 200, pp. 287–300, feb 2013.
- [166] S. D. Catz, “Regulation of vesicular trafficking and leukocyte function by Rab27 GTPases and their effectors,” *Journal of leukocyte biology*, vol. 94, pp. 613–22, oct 2013.
- [167] E. D. Elstak, M. Neeft, N. T. Nehme, J. Voortman, M. Cheung, M. Goodarzifard, H. C. Gerritsen, P. M. P. van Bergen En Henegouwen, I. Callebaut, G. de Saint Basile, and P. van der Sluijs, “The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane,” *Blood*, vol. 118, pp. 1570–8, aug 2011.
- [168] R. K. Singh, K. Mizuno, C. Wasmeier, S. T. Wavre-Shapton, C. Recchi, S. D. Catz, C. Futter, T. Tolmachova, A. N. Hume, and M. C. Seabra, “Distinct and opposing roles for Rab27a/Mlph/MyoVa and Rab27b/Munc13-4 in mast cell secretion,” *The FEBS journal*, vol. 280, pp. 892–903, feb 2013.
- [169] H. Bartuma, K. H. Nord, G. Macchia, M. Isaksson, J. Nilsson, H. A. Domanski, N. Mandahl, and F. Mertens, “Gene expression and single nucleotide polymorphism array analyses of spindle cell lipomas and conventional lipomas with 13q14 deletion,” *Genes, chromosomes & cancer*, vol. 50, pp. 619–632, aug 2011.
- [170] S. E. Woodfield, H. K. Graves, J. A. Hernandez, and A. Bergmann, “De-regulation of JNK and JAK/STAT signaling in ESCRT-II mutant tissues cooperatively contributes to neoplastic tumorigenesis,” *PloS one*, vol. 8, p. e56021, jan 2013.
- [171] J. Pencik, H. T. T. Pham, J. Schmoellerl, T. Javaheri, M. Schlederer, Z. Culig, O. Merkel, R. Moriggl, F. Grebien, and L. Kenner, “JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome,” *Cytokine*, vol. 87, pp. 26–36, nov 2016.
- [172] H. Yi, J. Ye, X.-M. Yang, L.-W. Zhang, Z.-G. Zhang, and Y.-P. Chen, “High-grade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis,” *International journal of clinical and experimental pathology*, vol. 8, no. 5, pp. 5062–70, 2015.
- [173] P. Peng, Y. Yan, and S. Keng, “Exosomes in the ascites of ovarian cancer patients: origin and effects on anti-tumor immunity,” *Oncology reports*, vol. 25, pp. 749–62, mar 2011.
- [174] M. Szajnik, M. Czystowska, M. J. Szczepanski, M. Mandapathil, and T. L. Whiteside, “Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg).,” *PloS one*, vol. 5, no. 7, p. e11469, 2010.
- [175] X. Xiang, A. Poliakov, C. Liu, Y. Liu, Z. B. Deng, J. Wang, Z. Cheng, S. V. Shah, G. J. Wang, L. Zhang, W. E. Grizzle, J. Mobley, and H. G. Zhang, “Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes,” *International Journal of Cancer*, vol. 124, no. 11, pp. 2621–2633, 2009.

- [176] J. L. Hood, R. S. San, and S. A. Wickline, “Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis,” *Cancer research*, vol. 71, pp. 3792–801, jun 2011.
- [177] J. M. Escola, M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie, and H. J. Geuze, “Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, pp. 20121–7, aug 1998.
- [178] G. van Niel, G. Raposo, C. Candalh, M. Boussac, R. Hershberg, N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman, “Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles,” *Gastroenterology*, vol. 121, pp. 337–49, aug 2001.
- [179] M. Aalberts, F. M. F. van Dissel-Emiliani, N. P. H. van Adrichem, M. van Wijnen, M. H. M. Wauben, T. A. E. Stout, and W. Stoorvogel, “Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans,” *Biology of reproduction*, vol. 86, p. 82, mar 2012.
- [180] T. S. Worst, Y. Meyer, M. Gottschalt, C.-A. Weis, J. von Hardenberg, C. Frank, A. Steidler, M. S. Michel, and P. Erben, “RAB27A, RAB27B and VPS36 are downregulated in advanced prostate cancer and show functional relevance in prostate cancer cells,” *International journal of oncology*, feb 2017.
- [181] F. Andre, N. E. C. Schartz, M. Movassagh, C. Flament, P. Pautier, P. Morice, C. Pomel, C. Lhomme, B. Escudier, T. Le Chevalier, T. Tursz, S. Amigorena, G. Raposo, E. Angevin, and L. Zitvogel, “Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes,” *Lancet (London, England)*, vol. 360, pp. 295–305, jul 2002.
- [182] J. Wolfers, A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Théry, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, and L. Zitvogel, “Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming,” *Nature medicine*, vol. 7, pp. 297–303, mar 2001.
- [183] R. Gastpar, M. Gehrman, M. A. Bausero, A. Asea, C. Gross, J. A. Schroeder, and G. Multhoff, “Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells,” *Cancer research*, vol. 65, pp. 5238–47, jun 2005.
- [184] V. L. Vega, M. Rodríguez-Silva, T. Frey, M. Gehrman, J. C. Diaz, C. Steinem, G. Multhoff, N. Arispe, and A. De Maio, “Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 180, pp. 4299–307, mar 2008.

- [185] I. S. Zeelenberg, M. Ostrowski, S. Krumeich, A. Bobrie, C. Jancic, A. Boissonnas, A. Delcayre, J.-B. Le Pecq, B. Combadière, S. Amigorena, and C. Théry, “Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses.,” *Cancer research*, vol. 68, pp. 1228–35, feb 2008.
- [186] T. Tolmachova, R. Anders, J. Stinchcombe, G. Bossi, G. M. Griffiths, C. Huxley, and M. C. Seabra, “A general role for Rab27a in secretory cells.,” *Molecular biology of the cell*, vol. 15, pp. 332–44, jan 2004.
- [187] M. Fukuda, “Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, pp. 2801–2813, sep 2008.
- [188] D. J. Gill, H. Teo, J. Sun, O. Perisic, D. B. Veprintsev, S. D. Emr, and R. L. Williams, “Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking.,” *The EMBO journal*, vol. 26, pp. 600–12, jan 2007.
- [189] G. L. Shaw, H. Whitaker, M. Corcoran, M. J. Dunning, H. Luxton, J. Kay, C. E. Massie, J. L. Miller, A. D. Lamb, H. Ross-Adams, R. Russell, A. W. Nelson, M. D. Eldridge, A. G. Lynch, A. Ramos-Montoya, I. G. Mills, A. E. Taylor, W. Arlt, N. Shah, A. Y. Warren, and D. E. Neal, “The Early Effects of Rapid Androgen Deprivation on Human Prostate Cancer.,” *European urology*, vol. 70, pp. 214–8, aug 2016.
- [190] B. J. Feldman and D. Feldman, “The development of androgen-independent prostate cancer.,” *Nature reviews. Cancer*, vol. 1, pp. 34–45, oct 2001.
- [191] J. Holzbeierlein, P. Lal, E. LaTulippe, A. Smith, J. Satagopan, L. Zhang, C. Ryan, S. Smith, H. Scher, P. Scardino, V. Reuter, and W. L. Gerald, “Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance.,” *The American journal of pathology*, vol. 164, pp. 217–27, jan 2004.
- [192] M. Lu, H. Lu, and Q. Kong, “Leading causes of castration-resistant prostate cancer.,” *Expert review of anticancer therapy*, vol. 15, pp. 425–32, apr 2015.
- [193] C.-K. Tsao, A. C. Small, M. D. Galsky, and W. K. Oh, “Overcoming castration resistance in prostate cancer.,” *Current opinion in urology*, vol. 22, pp. 167–74, may 2012.
- [194] P. Koivisto, J. Kononen, C. Palmberg, T. Tammela, E. Hyytinen, J. Isola, J. Trapman, K. Cleutjens, A. Noordzij, T. Visakorpi, and O. P. Kallioniemi, “Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer.,” *Cancer research*, vol. 57, pp. 314–9, jan 1997.
- [195] I. Romics, G. Bánfi, E. Székely, T. Krenács, and B. Szende, “Expression of p21(waf1/cip1), p27 (kip1), p63 and androgen receptor in low and high Gleason score prostate cancer.,” *Pathology oncology research : POR*, vol. 14, pp. 307–11, sep 2008.

- [196] S. Naskar, S. K. Kundu, N. K. Bhattacharyya, P. K. Bhattacharyya, and A. K. Kundu, "A study to correlate histopathology, biochemical marker and immunohistochemical expression of sex-steroid receptors in prostatic growth.," *Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*, vol. 35, pp. 40–3, jan 2014.
- [197] J. Brolin, L. Andersson, and P. Ekman, "Steroid receptor profile and receptor stability in subfractions of human prostatic tissues. Critical aspects on microassays.," *Urological research*, vol. 19, no. 6, pp. 327–31, 1991.
- [198] S. Shahbazi, M. Khorasani, and R. Mahdian, "Gene expression profile of FVII and AR in primary prostate cancer.," *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, jul 2016.
- [199] A. Fleischmann, C. Rocha, S. Schobinger, R. Seiler, B. Wiese, and G. N. Thalmann, "Androgen receptors are differentially expressed in Gleason patterns of prostate cancer and down-regulated in matched lymph node metastases.," *The Prostate*, vol. 71, pp. 453–60, apr 2011.
- [200] K.K. Miyamoto, S. A. McSherry, G. A. Dent, M. Sar, E. M. Wilson, F. S. French, Y. Sharief, and J. L. Mohler, "Immunohistochemistry of the androgen receptor in human benign and malignant prostate tissue.," *The Journal of urology*, vol. 149, pp. 1015–9, may 1993.
- [201] H. Yoshikawa, T. Ikeuchi, and Y. Kai, "[Immunohistochemical study of androgen receptor in adenocarcinoma of the human prostatic cancer].," *Nihon Hinyokika Gakkai zasshi. The japanese journal of urology*, vol. 87, pp. 956–63, jul 1996.
- [202] R. Li, T. Wheeler, H. Dai, A. Frolov, T. Thompson, and G. Ayala, "High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-free survival in prostate: cancer patients treated with radical prostatectomy.," *The American journal of surgical pathology*, vol. 28, pp. 928–34, jul 2004.
- [203] I. Husain, S. Shukla, P. Soni, and N. Husain, "Role of androgen receptor in prostatic neoplasia versus hyperplasia.," *Journal of cancer research and therapeutics*, vol. 12, no. 1, pp. 112–6, 2016.
- [204] D. Sanchez, D. Rosell, B. Honorato, J. Lopez, J. Arocena, and G. Sanz, "Androgen receptor mutations are associated with Gleason score in localized prostate cancer.," *BJU international*, vol. 98, pp. 1320–5, dec 2006.
- [205] H. Takeda, K. Akakura, M. Masai, S. Akimoto, R. Yatani, and J. Shimazaki, "Androgen receptor content of prostate carcinoma cells estimated by immunohistochemistry is related to prognosis of patients with stage D2 prostate carcinoma.," *Cancer*, vol. 77, pp. 934–40, mar 1996.

- [206] J. A. Ruizeveld de Winter, P. J. Janssen, H. M. Sleddens, M. C. Verleun-Mooijman, J. Trapman, A. O. Brinkmann, A. B. Santerse, F. H. Schröder, and T. H. van der Kwast, “Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer.,” *The American journal of pathology*, vol. 144, pp. 735–46, apr 1994.
- [207] M. V. Sadi and E. R. Barrack, “Image analysis of androgen receptor immunostaining in metastatic prostate cancer. Heterogeneity as a predictor of response to hormonal therapy.,” *Cancer*, vol. 71, pp. 2574–80, apr 1993.
- [208] C. Magi-Galluzzi, X. Xu, L. Hlatky, P. Hahnfeldt, I. Kaplan, P. Hsiao, C. Chang, and M. Loda, “Heterogeneity of androgen receptor content in advanced prostate cancer.,” *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 10, pp. 839–45, aug 1997.
- [209] L. S. Gorelic, D. L. Lamm, I. Ramzy, H. M. Radwin, and S. A. Shain, “Androgen receptors in biopsy specimens of prostate adenocarcinoma. Heterogeneity of distribution and relation to prognostic significance of receptor measurements for survival of advanced cancer patients.,” *Cancer*, vol. 60, pp. 211–9, jul 1987.

Eigene Publikationen

T. S. Worst, Y. Meyer, M. Gottschalt, C.-A. Weis, J. von Hardenberg, C. Frank, A. Steidler, M. S. Michel, and P. Erben, “**RAB27A, RAB27B and VPS36 are down-regulated in advanced prostate cancer and show functional relevance in prostate cancer cells.**,” *International journal of oncology*, Feb 2017

Anhang

Tabellen

| | | |
|-----|---|----|
| 5.1 | Übersicht der für die Gruppenvergleiche gebildeten Gruppen | 91 |
| 5.2 | Gruppenvergleiche RAB27A - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung | 92 |
| 5.3 | Gruppenvergleiche RAB27B - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung | 93 |
| 5.4 | Gruppenvergleiche VPS36 - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung .. | 94 |
| 5.5 | Gruppenvergleiche AR - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung | 95 |
| 5.6 | Korrelationsanalysen - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung | 96 |

Abbildungen

| | | |
|-----|---|----|
| 5.1 | Zeit bis zum Biochemischen Rezidiv abhängig von der Expression von Genen mit Rolle bei der exosomalen Sekretion | 97 |
|-----|---|----|

| Datensatz | Gruppierung nach... | Gruppen |
|---|---------------------------|---|
| Taylor <i>et al.</i> (DS1; GSE21032) | Gewebsherkunft | benigne PCa: Lokalisierte PCa Mx: Metastasen |
| | T-Stadium | benigne, T1, T2, T3+4 |
| | Gleason | benigne, $\leq 7a$, $> 7a$ |
| Yu <i>et al.</i> (DS2; GDS2547) | Gewebsherkunft | benigne: Normal + Adjacent PCa: Lokalisierte PCa Mx: Metastasen |
| | T-Stadium | benigne, T1, T2, T3 |
| | Gleason | benigne: Normal + Adjacent, ≤ 7 , > 7 |
| Tomlins <i>et al.</i> (DS3; GDS3289) | Gewebsherkunft | benigne PCa: Lokalisierte PCa Mx: Metastasen |
| | Gleason | benigne, $\leq 7a$, $> 7a$ |
| Tissue Scan Array | Gewebsherkunft | benigne PCa: Lokalisierte PCa |
| | T-Stadium | benigne, T2, T3 |
| | Gleason | benigne, $\leq 7a$, $>$ |
| TUR-Kohorte | Gewebsherkunft | benigne PCa: Lokalisierte PCa |
| | Gleason | benigne, ≤ 7 , > 7 |
| | Hormontherapie- Status | benigne, Hormonnativ, Hormonrefraktär |

Tabelle 5.1: Übersicht der für die Gruppenvergleiche gebildeten Gruppen. Um den Einfluss verschiedener Parameter (Gewebsherkunft, T-Stadium, Grading nach Gleason und Hormontherapie) auf die Expression der ausgewählten Gene zu untersuchen, wurden die Proben der verschiedenen Datenquellen jeweils gruppiert. Diese Tabelle gibt eine Übersicht über die verschiedenen Gruppen. (*PCa: Prostatakarzinom, Mx: Metastasen*)

| Auswertung | Details | p-Wert |
|--------------------------------------|---|---------|
| Gewebeart | | |
| <i>Taylor et al. (DS1; GSE21032)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 28,89$; | < 0,001 |
| Dunn benigne vs. PCa | benigne: 0,82; PCa: 1,03, | < 0,001 |
| Dunn PCa vs. Mx | PCa: 1,03; Mx: 0,34 | 0,001 |
| Dunn benigne vs. Mx | benigne: 0,82; Mx: 0,34 | 1,000 |
| <i>Yu et al. (DS2; GDS2547)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 7,65$ | 0,022 |
| Dunn benigne vs. PCa | benigne: 0,92; PCa: 0,78 | 0,483 |
| Dunn PCa vs. Mx | PCa: 0,78; Mx: 0,71 | 0,296 |
| Dunn benigne vs. Mx | benigne: 0,92; Mx: 0,71 | 0,020 |
| <i>Tomlins et al. (DS3; GDS3289)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 16,97$ | < 0,001 |
| Dunn benigne vs. PCa | benigne: 0,97; PCa: 0,77 | 0,146 |
| Dunn PCa vs. Mx | PCa: 0,77; Mx: 0,59 | 0,032 |
| Dunn benigne vs. Mx | benigne: 0,97; Mx: 0,59 | < 0,001 |
| <i>Tissue Scan Array</i> | | |
| Mann-Whitney U benigne vs PCa | U = 171; z = 0,304, benigne: 0,92; PCa: 0,86 | 0,776 |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Mann-Whitney U benigne vs PCa | U = 200; z = -0,119, benigne: 1,15 ; PCa: 1,11 | 0,906 |
| Lokales Tumorstadium | | |
| <i>Taylor et al. (DS1; GSE21032)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(3) = 4,41$ | 0,22 |
| <i>Yu et al. (DS2; GDS2547)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(3) = 7,043$ | 0,071 |
| <i>Tissue Scan Array</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 0,03$ | 0,985 |
| Gleason | | |
| <i>Taylor et al. (DS1; GSE21032)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 3,51$ | 0,170 |
| <i>Yu et al. (DS2; GDS2547)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 1,69$ | 0,430 |
| <i>Tomlins et al. (DS3; GDS3289)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 8,503$ | 0,014 |
| Dunn benigne vs. < 7b | benigne: 0,97; < 7b: 1,15 | 1,000 |
| Dunn < 7b vs > 7b | <7b: 1,15; > 7b: 0,59 | 0,056 |
| Dunn benigne vs > 7b | benigne: 0,96; > 7b: 0,59 | 0,036 |
| <i>Tissue Scan Array</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 1,929$; | 0,381 |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 1,67$ | 0,435 |
| Hormontherapie-Status | | |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 4,273$ | 0,118 |

Tabelle 5.2: Gruppenvergleiche RAB27A - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung. Innerhalb der Datensätze wurden die Proben gruppiert (Für eine Übersicht siehe Tabelle 5.1) und die Expressionen der jeweiligen Gruppen miteinander verglichen. Bei keinem der untersuchten Datensätzen waren die Genexpressions-Werte normalverteilt, sodass nonparametrische Tests verwendet wurden: Lagen zwei Gruppen vor, wurde der Mann-Whitney U Test verwendet, bei drei oder mehr der Kruskal Wallis H Test. Lag bei letzterem ein statistisch signifikantes Ergebnis vor, wurden Posthoc-Tests nach Dunn angeschlossen. In der Spalte *Details* sind bei den Kruskal Wallis Tests Freiheitsgrade und H-Wert angegeben, bei den Dunn-Tests die Mediane der verglichenen Gruppen und bei den Mann-Whitney Tests U-Wert, z-Score und Mediane. Die Mediane sind als relative Genexpression normalisiert auf die interne Kontrolle relativ zum Kalibrator ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) angegeben.

| Auswertung | Details | p-Wert |
|--------------------------------------|---|---------|
| Gewebeart | | |
| <i>Taylor et al. (DS1; GSE21032)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 14,75$ | 0,001 |
| Dunn benigne vs. PCa | benigne: 0,88; PCa: 0,96 | 1,000 |
| Dunn PCa vs. Mx | PCa: 0,96; Mx: 0,56 | <0,001 |
| Dunn benigne vs. Mx | benigne: 0,88; Mx: 0,56 | 0,008 |
| <i>Yu et al. (DS2; GDS2547)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 28,7$ | < 0,001 |
| Dunn benigne vs. PCa | benigne: 0,94; PCa: 1,09 | 0,772 |
| Dunn PCa vs. Mx | PCa: 1,09; Mx: 0,43 | < 0,001 |
| Dunn benigne vs. Mx | benigne: 0,94; Mx: 0,43 | < 0,001 |
| <i>Tomlins et al. (DS3; GDS3289)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 40,69$ | <0,001 |
| Dunn benigne vs. PCa | benigne: 1,00; PCa: 0,76 | 0,005 |
| Dunn PCa vs. Mx | PCa: 0,76; Mx: 0,54 | <0,001 |
| Dunn benigne vs. Mx | benigne: 1,00; Mx: 0,54 | <0,001 |
| <i>Tissue Scan Array</i> | | |
| Mann-Whitney U benigne vs PCa | U = 132, z = -0,775 benigne: 1,00; PCa: 1,23 | 0,454 |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Mann-Whitney U benigne vs PCa | U = 123, z = -1,945 benigne: 0,99; PCa: 1,71 | 0,052 |
| Lokales Tumorstadium | | |
| <i>Taylor et al. (DS1; GSE21032)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(3) = 0,133$ | 0,988 |
| <i>Yu et al. (DS2; GDS2547)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(3) = 8,1$ | 0,044 |
| Dunn posthoc Tests allesamt p > 0,05 | | |
| <i>Tissue Scan Array</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 0,7$ | 0,706 |
| Gleason | | |
| <i>Taylor et al. (DS1; GSE21032)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 2,64$ | 0,268 |
| <i>Yu et al. (DS2; GDS2547)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 3,008$ | 0,222 |
| <i>Tomlins et al. (DS3; GDS3289)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 14,85$ | 0,001 |
| benigne vs. < 7b | benigne: 1,00; < 7b: 0,82 | 0,026 |
| < 7b vs > 7b | < 7b: 0,82; > 7b: 0,73 | 1,000 |
| benigne vs > 7b | benigne: 1,00; > 7b: 0,73 | 0,001 |
| <i>Tissue Scan Array</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 0,938$ | 0,625 |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 6,22$ | 0,045 |
| benigne vs. 6-7 | benigne: 0,99; 6+7: 1,99 | 0,151 |
| 6-7 vs 8-9 | 6+7: 1,99; 8+9: 1,99 | 1,000 |
| benigne vs. 8-9 | benigne: 0,99; 8+9: 1,99 | 0,151 |
| Hormontherapie-Status | | |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 3,81$ | 0,149 |

Tabelle 5.3: Gruppenvergleiche RAB27B - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung. Für eine Erläuterung der einzelnen Spalten siehe Tabelle 5.2 auf Seite 92.

| Auswertung | Details | p-Wert |
|--------------------------------------|--|---------|
| Gewebeart | | |
| <i>Taylor et al. (DS1; GSE21032)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 35,67$ | <0,001 |
| Dunn benigne vs. PCa | benigne: 0,96; PCa: 0,90 | 0,299 |
| Dunn PCa vs. Mx | PCa: 0,90; Mx: 0,51 | <0,001 |
| Dunn benigne vs Mx | benigne: 0,96; Mx: 0,51 | <0,001 |
| <i>Yu et al. (DS2; GDS2547)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 22,07$ | < 0,001 |
| Dunn benigne vs. PCa | benigne: 0,72; PCa: 0,67 | 0,283 |
| Dunn PCa vs. Mx | PCa: 0,67; Mx: 0,44 | 0,002 |
| Dunn benigne vs Mx | benigne: 0,72; Mx: 0,44 | < 0,001 |
| <i>Tomlins et al. (DS3; GDS3289)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 24,41$ | <0,001 |
| Dunn benigne vs. PCa | benigne: 1,00; PCa: 0,94 | 0,056 |
| Dunn PCa vs. Mx | PCa: 0,94; Mx: 0,84 | 0,007 |
| Dunn benigne vs Mx | benigne: 1,00; Mx: 0,84 | <0,001 |
| <i>Tissue Scan Array</i> | | |
| Mann-Whitney U benigne vs PCa | U = 201, z = 1,134 benigne: 1,03; PCa: 0,94 | 0,268 |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Mann-Whitney U benigne vs PCa | U = 301, z = 2,278 benigne: 1,03; PCa: 0,72 | 0,023 |
| Lokales Tumorstadium | | |
| <i>Taylor et al. (DS1; GSE21032)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(3) = 3,369$ | 0,338 |
| <i>Yu et al. (DS2; GDS2547)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(3) = 3,538$ | 0,316 |
| <i>Tissue Scan Array</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 2,44$ | 0,295 |
| Gleason | | |
| <i>Taylor et al. (DS1; GSE21032)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 7,45$ | 0,024 |
| benigne vs. < 7b | benigne: 0,96; <7b: 0,91 | 0,691 |
| < 7b vs > 7b | <7b: 0,91; >7b: 0,83 | 0,115 |
| benigne vs > 7b | benigne: 0,96; >7b: 0,83 | 0,024 |
| <i>Yu et al. (GDS2547)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 4,476$ | 0,107 |
| <i>Tomlins et al. (DS3; GDS3289)</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 9,85$ | 0,007 |
| benigne vs. < 7b | benigne: 1,00; < 7b: 0,96 | 0,533 |
| < 7b vs > 7b | < 7b: 0,96; > 7b: 0,93 | 0,466 |
| benigne vs > 7b | benigne: 1,00; > 7b: 0,93 | 0,005 |
| <i>Tissue Scan Array</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 2,7$ | 0,259 |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 3,301$ | 0,192 |
| Hormontherapie-Status | | |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 10,641$ | 0,005 |
| benigne vs HN | benigne: 1,03; HN: 0,93 | 1,000 |
| HN vs HR | HN: 0,93; HR: 0,61 | 0,059 |
| benigne vs HR | benigne: 1,03; HR: 0,61 | 0,013 |

Tabelle 5.4: Gruppenvergleiche VPS36 - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung. Für eine Erläuterung der einzelnen Spalten siehe Tabelle 5.2 auf Seite 92.

| Auswertung | Details | p-Wert |
|-------------------------------|---|--------|
| Gewebeart | | |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Mann-Whitney U benigne vs PCa | U = 110, z = -2,254 benigne: 0,99; PCa: 2,70 | 0,024 |
| Gleason | | |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 6,912$ | 0,032 |
| benigne vs. 6-7 | benigne: 0,99; 6+7: 0,67 | 0,726 |
| 6-7 vs 8-9 | 6+7: 0,67; 8+9: 1,73 | 0,030 |
| benigne vs. 8-9 | benigne: 0,99; 8+9: 1,73 | 0,130 |
| Hormontherapie-Status | | |
| <i>TUR-Kohorte</i> | | |
| Kruskal Wallis | $\chi^2(2) = 19,83$ | <0,001 |
| benigne vs HN | HN: 0,92; benigne: 0,99 | 1,000 |
| HN vs HR | HR: 6,06; HN: 0,92 | <0,001 |
| benigne vs HR | HR: 6,06; benigne: 0,99 | 0,003 |

Tabelle 5.5: Gruppenvergleiche AR - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung. Für eine Erläuterung der einzelnen Spalten siehe Tabelle 5.2 auf S. 92.

| Datensatz | Korrelationspartner | r_s | p-Wert | Sig. |
|---|---------------------|-------|---------|------|
| Taylor <i>et al.</i> (DS1; GSE21032) | RAB27A vs. RAB27B | 0,64 | < 0,001 | *** |
| | RAB27A vs. VPS36 | 0,49 | < 0,001 | *** |
| | RAB27B vs. VPS36 | 0,63 | < 0,001 | *** |
| Yu <i>et al.</i> (DS2; GDS2547) | RAB27A vs. RAB27B | 0,38 | < 0,001 | *** |
| | RAB27A vs. VPS36 | 0,25 | 0,020 | * |
| | RAB27B vs. VPS36 | 0,16 | 0,128 | ns |
| Tomlins <i>et al.</i> (DS3; GDS3289) | RAB27A vs. RAB27B | 0,54 | 0,001 | ** |
| | RAB27A vs. VPS36 | 0,14 | 0,427 | ns |
| | RAB27B vs. VPS36 | 0,39 | 0,005 | ** |
| Tissue Scan Array | RAB27A vs. RAB27B | 0,40 | 0,011 | * |
| | RAB27A vs. VPS36 | 0,04 | 0,785 | ns |
| | RAB27B vs. VPS36 | 0,51 | 0,001 | ** |
| TUR- Kohorte | RAB27A vs. RAB27B | 0,39 | 0,010 | * |
| | RAB27A vs. VPS36 | 0,65 | < 0,001 | *** |
| | RAB27A vs. AR | 0,07 | 0,676 | ns |
| | RAB27B vs. VPS36 | 0,41 | 0,005 | ** |
| | RAB27B vs. AR | 0,47 | 0,002 | ** |
| | VPS36 vs. AR | -0,07 | 0,680 | ns |

Tabelle 5.6: Korrelationsanalysen - detaillierte Ergebnisse der statistischen Auswertung. In den vorliegenden Kohorten wurden für die jeweiligen Gene untereinander Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt. In der dritten und vierten Spalte sind jeweils r_s und p-Werte angegeben. Die Spalte *Sig.* liefert zur besseren Übersicht eine semiquantitative Zusammenfassung der p-Werte: ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; * $p < 0,05$; *ns*: $p > 0,05$.

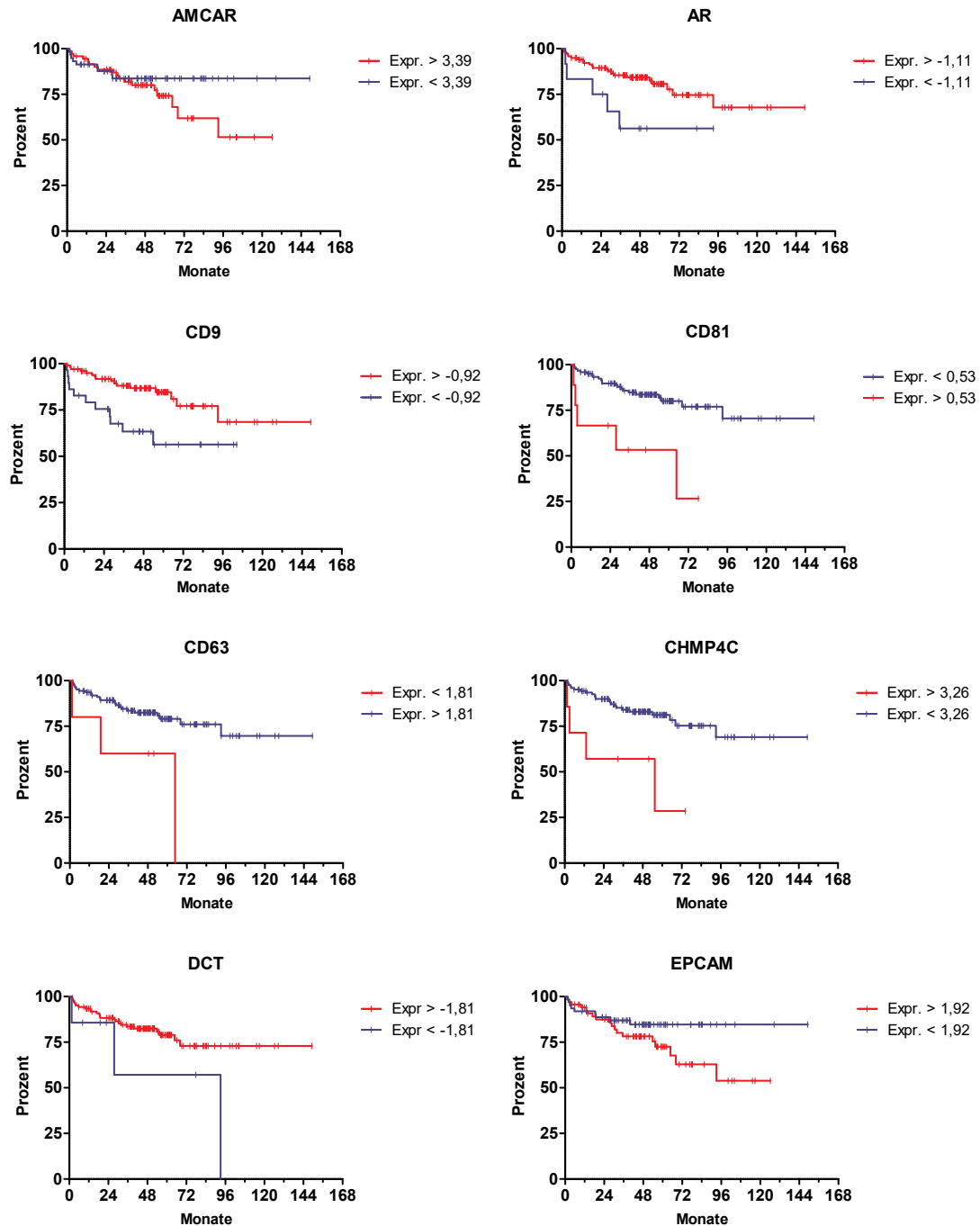


Abbildung 5.1: Zeit bis zum Biochemischen Rezidiv abhängig von der Expression von Genen mit Rolle bei der exosomalen Sekretion. Die Expressions-Grenzwerte und Kaplan-Meier-Analysen wurden auf Basis eines Microarraydatensatzes von Taylor *et al.* (DS1) (2010)⁸⁰ erstellt. Die Genexpression (Expr.) ist als Z-Scores vs. normals angegeben. (Fortsetzung auf Seite 98)

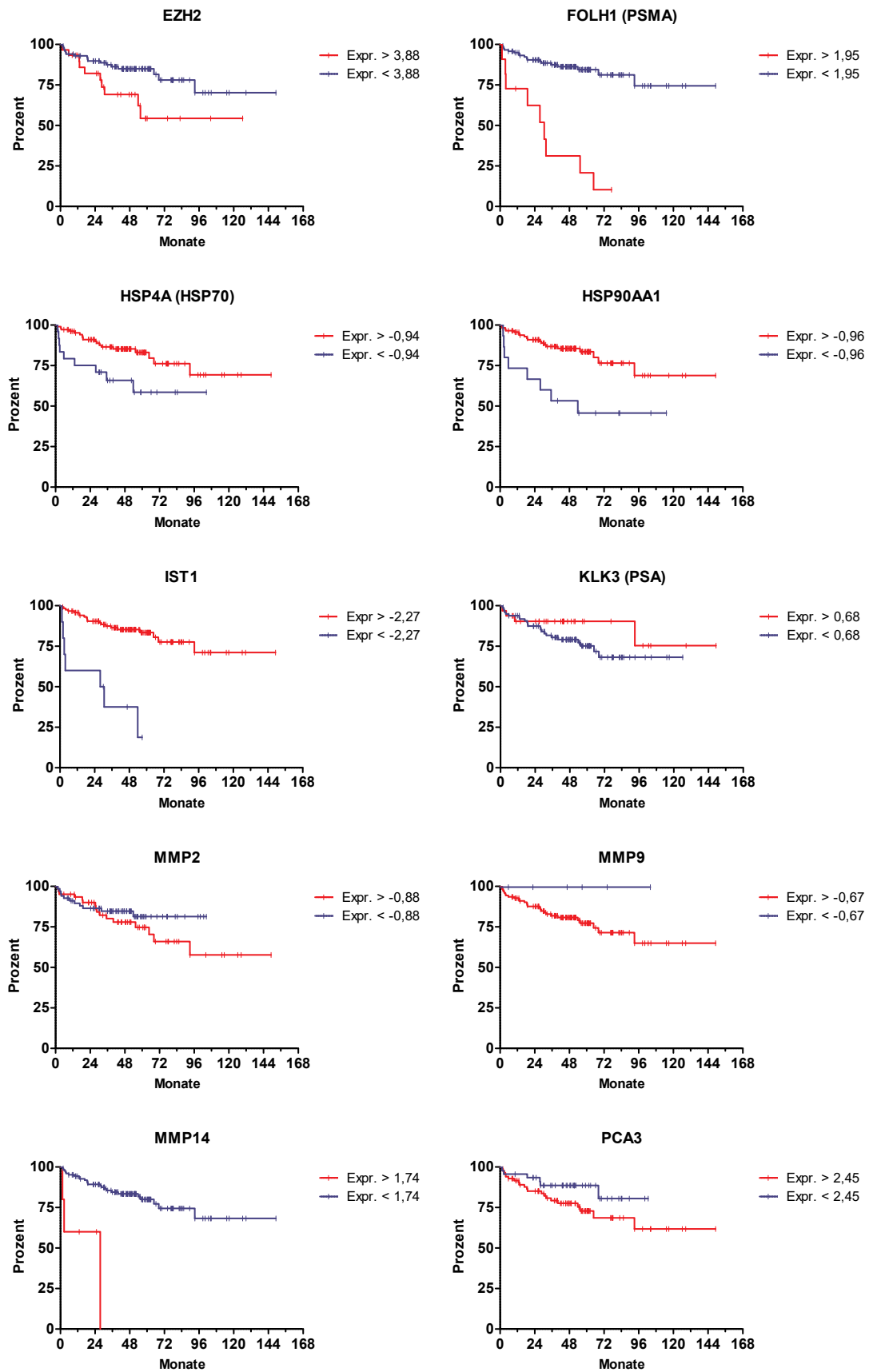


Abbildung 5.1: Zeit bis zum Biochemischen Rezidiv abhängig von der Expression von Genen mit Rolle bei der exosomalen Sekretion. (Fortsetzung von Seite 97)

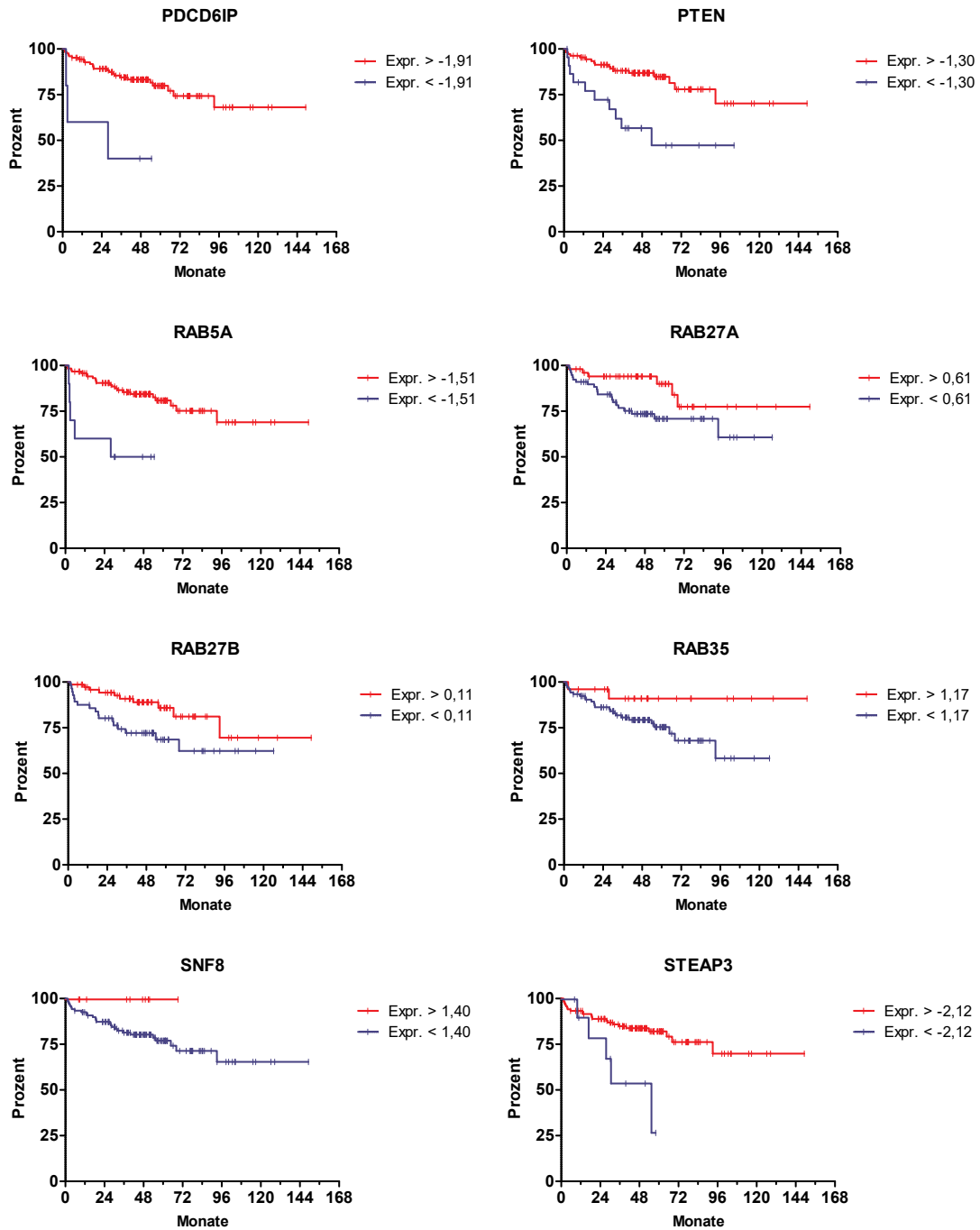


Abbildung 5.1: Zeit bis zum Biochemischen Rezidiv abhängig von der Expression von Genen mit Rolle bei der exosomalen Sekretion. (Fortsetzung von Seite 98)

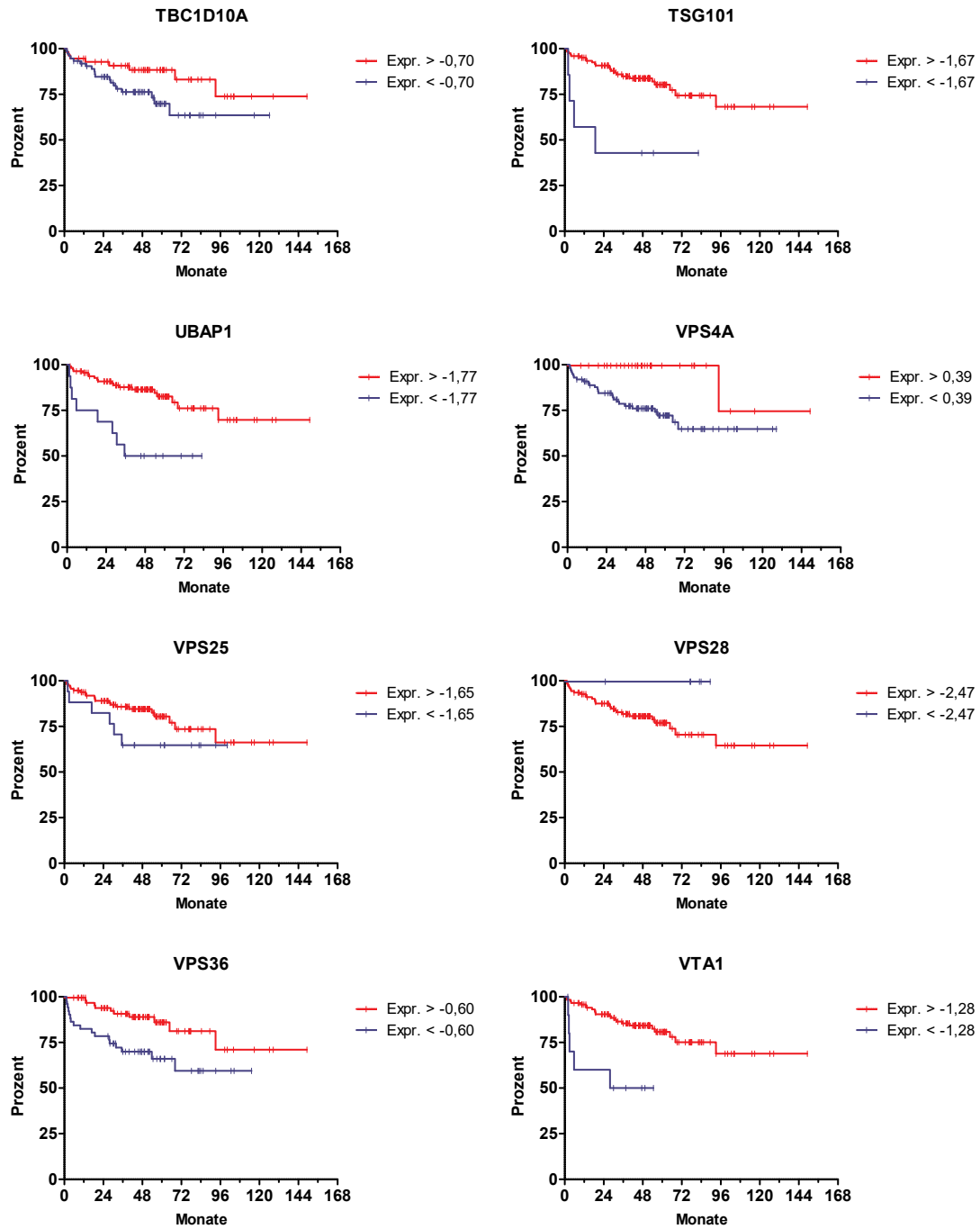


Abbildung 5.1: Zeit bis zum Biochemischen Rezidiv abhängig von der Expression von Genen mit Rolle bei der exosomalen Sekretion. (Fortsetzung von Seite 99)

Lebenslauf

PERSONALIEN

Name und Vorname: Yannic Meyer
Geburtsdatum: 05.01.1990
Geburtsort: Wolfhagen
Familienstand: Ledig
Vater: Dr. Klaus Meyer
Mutter: Rosemarie Meyer

SCHULISCHER WERDEGANG

1996 - 2000: Grundschule Harleshausen
2000 - 2006: Heinrich-Schütz-Schule
2006 - 2009: Jacob-Grimm-Schule
Abitur: 15.06.2009

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2010/11 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
2012, August 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2016, April 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2017, Mai 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Danksagung

Diese Dissertation zu erstellen und die zugehörigen Untersuchungen durchzuführen, wäre nicht ohne die wertvolle Unterstützung einiger lieber und kompetenter Menschen möglich gewesen, denen ich meine Dankbarkeit ausdrücken möchte.

Philipp Erben und Thomas Worst für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung, die angenehme, empathische Zusammenarbeit und stets niederschwellige Erreichbarkeit. Veronica Schreindorfer für ihre liebe Unterstützung in allen Phasen des Projektes, für das Teilen der Freude an der Entdeckung und für ihre Unterstützung beim naturgegebenem Seegang in der experimentellen Arbeit.

Meinen Eltern für viele hilfreiche Hinweise zu Formulierungen und ihren unerbittlichen Kampf für die Orthographie.

Jakob Kather für fruchtbaren Austausch über die Materie und für hilfreiche Kommentare zur Dissertationsschrift.

Prof. Alexander Marx, Cleo Weis und Maria Gottschalt für die Unterstützung beim Zusammenstellen der cDNA-Kohorte und die Einarbeitung in die mikroskopische Evaluation des Materials.

Und Annette Steidler für ihre geduldige und gutmütige Einarbeitung in die Arbeiten im Labor und stete Verfügbarkeit für Fragen bei kleineren und größeren Problemen. Ihrem Wesen ist zu verdanken, dass stets eine förderliche, angenehme Atmosphäre herrschte.

Ohne Sie und Euch wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen
und ich danke Euch von ganzem Herzen.